



**PCT**

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C07C 237/00, C07F 9 /09, A61K 31 /66, A61P 37 /02</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/00462</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 6 janvier 2000 (06.01.00)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/01170</p> <p>(22) Date de dépôt international: 23 juin 1999 (23.06.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: PCT/FR98/01396 30 juin 1998 (30.06.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): OM PHARMA [CH/CH]; 22, rue du Bois-du-Lan, P.O. Box 84, CH-1217 Meyrin 2 (CH).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAUER, Jacques [CH/CH]; Chemin de la Moraine, 31, CH-1162 Saint-Prex (CH). MARTIN, Olivier, Richard [CH/FR]; 62 bis, avenue Dauphine, F-45100 Orléans (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 85, rue Anatole-France, F-92300 Levallois-Perret (FR).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/01170</p> <p>(22) Date de dépôt international: 23 juin 1999 (23.06.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: PCT/FR98/01396 30 juin 1998 (30.06.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): OM PHARMA [CH/CH]; 22, rue du Bois-du-Lan, P.O. Box 84, CH-1217 Meyrin 2 (CH).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAUER, Jacques [CH/CH]; Chemin de la Moraine, 31, CH-1162 Saint-Prex (CH). MARTIN, Olivier, Richard [CH/FR]; 62 bis, avenue Dauphine, F-45100 Orléans (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 85, rue Anatole-France, F-92300 Levallois-Perret (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/01170</p> <p>(22) Date de dépôt international: 23 juin 1999 (23.06.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: PCT/FR98/01396 30 juin 1998 (30.06.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): OM PHARMA [CH/CH]; 22, rue du Bois-du-Lan, P.O. Box 84, CH-1217 Meyrin 2 (CH).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAUER, Jacques [CH/CH]; Chemin de la Moraine, 31, CH-1162 Saint-Prex (CH). MARTIN, Olivier, Richard [CH/FR]; 62 bis, avenue Dauphine, F-45100 Orléans (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 85, rue Anatole-France, F-92300 Levallois-Perret (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>			
<p>(54) Title: NOVEL ACYL PSEUDODIPEPTIDES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME</p> <p>(54) Titre: NOUVEAUX PSEUDODIPEPTIDES ACYLES, LEUR MODE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES EN RENFERMANT</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{X-A-(CH}_2\text{)}_m\text{-CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-CH-(CH}_2\text{)}_q\text{-B-Y} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{NHR}_1 \qquad \qquad \text{NHR}_2 \end{array} \quad (I)</math> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the field of chemistry and more particularly of therapeutic chemistry. It concerns N-acyl pseudodipeptides corresponding to general formula (I) wherein the substituents A, B, X, Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, n, m, p and q are as defined in the claims. The invention also concerns pharmaceutical compositions containing as active principle at least one compound of general formula (I) in acid form or salified by a mineral or organic base. Said compounds have interesting pharmacological properties which make them useful as medicines.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement à celui de la chimie thérapeutique. Elle a pour objet des pseudodipeptides N-acylés répondant à la formule générale (I) dans laquelle les substituants A, B, X, Y, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, n, m, p et q ont les définitions fournies dans les revendications. L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale (I) sous forme acide ou salifiée par une base minérale ou organique. Les composés selon l'invention manifestent des propriétés pharmacologiques intéressantes qui les rendent utiles comme médicaments.</p>				

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

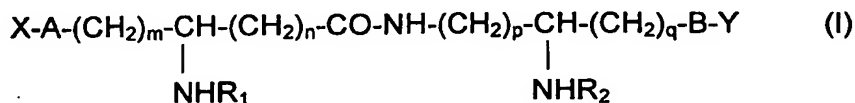
**NOUVEAUX PSEUDODIPEPTIDES ACYLES  
LEUR MODE DE PREPARATION ET LES  
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES EN RENFERMANT**

5 La présente invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement au domaine de la chimie thérapeutique.

Elle a plus particulièrement pour objet des pseudodipeptides dérivés d'acides aminés hydroxylés, dont les fonctions amine libres sont amidifiées par des acides  
10 gras.

Elle a spécifiquement pour objet des pseudodipeptides N-acylés dont au moins un groupe hydroxyle est estérifié par un groupement acide sous forme neutre ou chargée, répondant à la formule générale I.

15



20

dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou des substituants choisis parmi les hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en  $C_1 - C_{24}$ ) thio

25 les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur variant de 1 à 10

le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur variant de 0 à 10

X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide sous forme neutre ou chargée,

avec la limitation que l'un au moins des substituants X et Y représente un groupe  
30 acide sous forme neutre ou chargée,

A et B représentent chacun, distinctement l'un de l'autre, un atome d'oxygène, de soufre ou le groupe imino -NH-

Les groupes acides X et Y sont choisis de préférence parmi les groupements :

- carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]
- CH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH] [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH] avec m = 0 à 5 et n = 0 à 5
- phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]
- 5 -dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]
- diméthoxyphosphoryle
- phosphono
- hydroxysulfonyle
- hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]
- 10 -hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]

Lorsque les substituants X et/ou Y représentent un groupe acide sous forme neutre, il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique ou phosphorique libre. Lorsqu'il s'agit d'un groupe acide sous forme chargée il s'agit de la forme carboxylique, sulfonique  
 15 ou phosphorique salifiée, notamment par addition d'une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible. Lorsque les bases ne sont pas thérapeutiquement compatibles, elles peuvent servir de moyen d'identification, de purification ou de dédoublement.

- 20 Le même raisonnement s'applique au cas où X et/ou Y représentent un groupe carboxyalkyle, ou alkylènebiscarboxylique, hydroxysulfonyle, hydroxysulfonylalkyle, hydroxysulfonyloxyalkyle, phosphonoalkyle, phosphoryloxyalkyle.

- 25 Parmi les bases salifiantes thérapeutiquement compatibles on citera notamment les bases alcalines comme les hydroxydes de sodium, de potassium, de lithium, les sels d'ammonium ; les bases alcalinoterreuses comme les hydroxydes de calcium ou de strontium, les sels de magnésium, les sels de métaux ferreux et similaires, les bases organiques comme celles dérivées d'amines primaires, secondaires ou tertiaires comme la méthylamine, la diéthylamine, la monoéthanolamine, la diéthanolamine, la  
 30 benzylamine, la N-méthylbenzylamine, la vératrylamine, la triméthoxybenzylamine, des aminoacides à réaction basique comme la lysine ou l'ornithine ou des sucres aminés.



Des bases non utilisables thérapeutiquement sont par exemple la brucine, la strychnine, l'agmatine, l'homarine, la glucosamine, la N-méthylglucosamine ou la N-méthylmorpholine. Comme indiqué ci-dessus les sels en découlant serviront comme moyen de séparation ou d'identification.

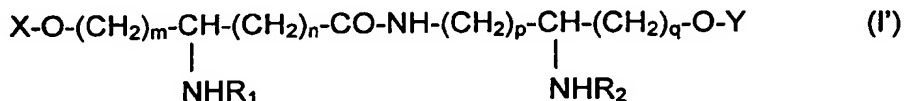
5

Lorsque m est égal à 1 et n est égal à 0, la molécule dérive de la sérine. Lorsque m est égal à 2 et n est égal à 0, la molécule dérive de l'homosérine. Lorsque m est égal à 3 et n est égal à 0, il s'agit d'un dérivé de la pentahomosérine. Lorsque m est égal à 4 et n est égal à 0, il s'agit d'un dérivé de l'hexahomosérine.

10

Lorsque p est égal à 3 et q est égal à 1, il peut s'agir d'un dérivé de la citrulline ou de l'ornithine ou de l'arginine. Lorsque p est égal à 4 et q est égal à 1, il peut s'agir d'un dérivé de l'homoarginine ou de la lysine

15 Parmi les pseudodipeptides objet de l'invention, on retiendra particulièrement comme composés actuellement préférés les composés de formule générale I':



20

dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe  
25 formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio

les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe phosphono  
30 et notamment

- les 1 et/ou 10-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et leurs sels d'addition avec une base minérale ou organique.

35

- le 1,10-bis(dihydrogénophosphate) de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.
- 5 - le 1,10-bis(dihydrogénophosphate) de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.
- le 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-  
10 hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.
- le 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadecane 1,10-diol et ses sels  
15 d'addition avec une base minérale ou organique.
- le 10-dihydrogénophosphate de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadecane 1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.

20

La définition de  $R_1$  et  $R_2$  englobe des dérivés acyles à chaîne de longueur variable, identiques ou différents, ramifiés ou en chaîne droite, saturés ou insaturés, pouvant porter un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé par un alkyle, amino, acylamino, hydroxyle, alkoxy, acyloxy, acylthio et alkylthio.

25

Des exemples de tels dérivés acylés substitués, sont le radical ricinoléyle, 12-hydroxystéaroyle, 2-hydroxy-3-méthylbutyroyle, 3-hydroxy-2-aminopentanoyle, palmitoléyle, élaidyle, éléostéaroyle, arachidoyle, arachidonyle, gadoléyle, béhényle, érucyle, 8-méthyldécanoyle, 9-méthyldécanoyle, docosa-hexaénoyle ou  
30 eicosapentaénoyle.

Parmi les groupements acyle concernés, l'acide 3-hydroxymyristique et l'acide 3-lauryloxy-myristique sont ceux actuellement préférés.

Les composés de formule générale I et notamment les composés mono et bis phosphorylés désignés sous le nom de code OM-294-MP (MP) et OM-294-DP (DP), respectivement, se distinguent par des propriétés pharmacologiques intéressantes, notamment immunomodulatrices. Ils trouvent un intérêt particulier dans la  
5 thérapeutique des maladies liées à une déficience des défenses immunitaires ou à une exagération des réponses immunitaires, selon les doses utilisées. Ils trouvent également un intérêt dans la thérapie des cancers et comme adjuvant ou potentialisateur dans les vaccins.

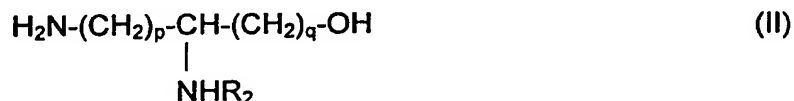
Ils trouvent également une utilisation comme vecteur de molécule d'intérêt  
10 thérapeutique par leurs propriétés d'association non-covalente de nature hydrophile et hydrophobe. Leur caractère amphiphile favorise les formulations et le transport des molécules d'intérêt thérapeutique vers les récepteurs membranaires, ainsi que vers les parois et le cytoplasme cellulaires. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association avec une molécule d'intérêt thérapeutique par voie orale, parentérale,  
15 rectale, topique, percutanée, ou permuqueuse. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association avec une molécule d'intérêt thérapeutique par incubation extratemporanément *ex-vivo* avec des cellules sanguines afin de rendre les cellules immunocompétentes avant de les réinoculer *in-vivo* par voie parentérale.

Les molécules MP et DP montrent des propriétés semblables, en tant qu'adjuvants  
20 du système immunitaire utilisés par exemple pour la vaccination, en association avec les antigènes appropriés, contre des maladies d'origine virale, parasitaire, microbienne ou fongique. Par contre, les composés selon l'invention montrent des propriétés fondamentalement différentes dans leur capacité à induire la production de cytokines ou la maturation des cellules souches immunocompétentes provenant  
25 des organes hématopoïétiques et lymphoïdes.

Le composé MP favorise la maturation et la différenciation des monocytes en cellules dendritiques fonctionnelles, en présence ou en absence de l'antigène approprié et contribue ainsi à renforcer l'immunité humorale et cellulaire. Le composé DP montre de son côté des propriétés anti-tumorales.

30 Les composés selon l'invention sont particulièrement intéressants du fait de leur faible toxicité. Ils sont utilisés en thérapeutique humaine ou animale à des doses qui varient de 0.025 mg à 100 mg par prise unitaire et de 0.05 à 200 mg par jour.

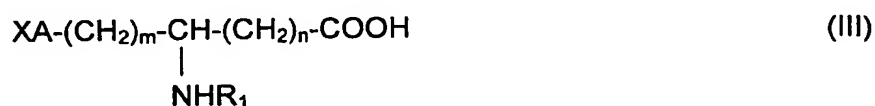
La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention des pseudodipeptides de formule générale I, qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position (q+1) et en position  $\omega$  d'un acide diaminé par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse respectivement, on soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, on libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $R_2OH$  dans laquelle  $R_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale II



dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent chacun un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte, avec un dérivé d'un  $\omega$ -hydroxy,  $\omega$ -amino ou  $\omega$ -thio amino acide de formule générale III



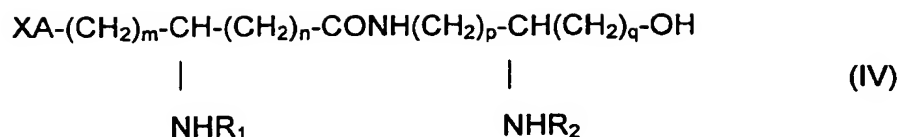
dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment,

m est un nombre entier variant de 1 à 10

et n est un nombre entier variant de 0 à 10

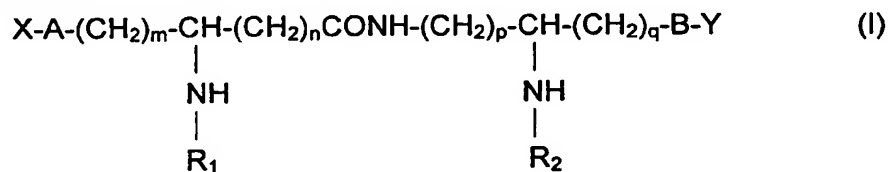
et X est un groupe acide défini comme précédemment qui peut être sous forme estérifiée

pour former le pseudodipeptide de formule générale IV



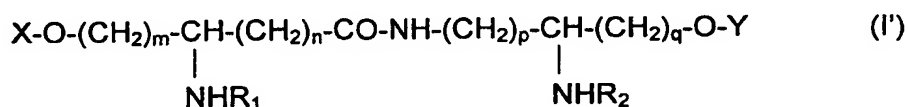
5 dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$ , et les descripteurs  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis comme précédemment,

dont on peut -si désiré- substituer, alkyliser ou acyler la fonction alcool terminal libre par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et soumettre à une hydrogénation catalytique ou à un autre processus de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I



dans laquelle A, B et les substituants X, Y,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $n$ ,  $m$ ,  $p$  et  $q$  ont les significations fournies antérieurement.

20 L'invention concerne aussi un procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale I'



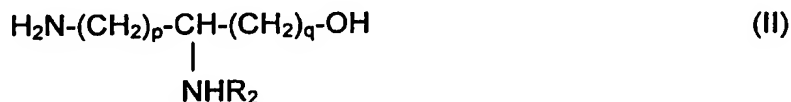
dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyl en  $C_1$  -  $C_{24}$ ) thio

les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

dans laquelle X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe phosphono qui consiste en ce qu'on bloque les fonctions amine en position  $(q+1)$  et en  $\omega$  d'un acide diaminé de formule  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_p\text{CHNH}_2(\text{CH}_2)_{q-1}\text{COOH}$  par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction

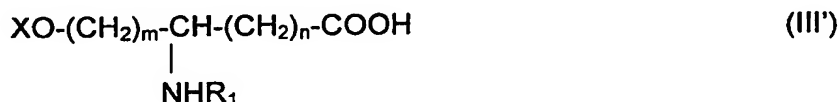
carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $R_2OH$  dans laquelle  $R_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale II



dans laquelle  $R_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,

p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé fonctionnel d' $\omega$ -hydroxy amino acide de formule générale III'



dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, non substitué ou portant un ou plusieurs substituants

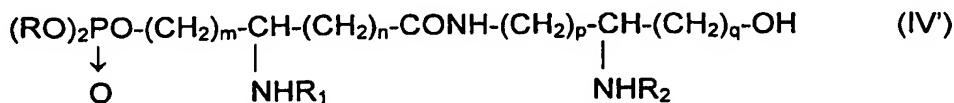
m est un nombre entier variant de 1 à 10

n est un nombre entier variant de 0 à 10

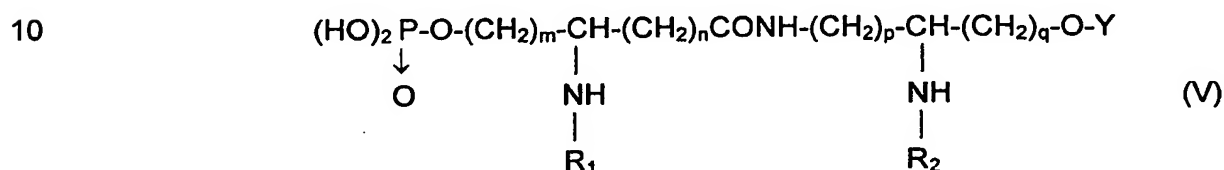
et X est un radical dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryle de formule  $(RO)_2P-$



pour former le pseudodipeptide de formule générale IV'



dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et les descripteurs  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis comme précédemment, et  $R$  est un radical labile par hydrogénolyse, dont on peut -si désiré- phosphoryler l'autre fonction alcool par un agent de phosphorylation si nécessaire en présence d'un agent de couplage, et soumettre à une hydrogénation catalytique d'une part pour débloquer la fonction alcool éventuellement présente sur le groupe acyle  $R_2$  et d'autre part libérer la fonction phosphate puis débloquer par hydrogénolyse la deuxième fonction phosphate éventuellement présente, de façon à obtenir le dérivé de formule générale V



dans laquelle Y représente soit un hydrogène soit un groupe phosphono et si désiré, on effectue l'étape supplémentaire de salification à l'aide d'une base minérale ou organique.

La stéréochimie des centres porteurs de groupes acylamino est déterminée par la configuration des acides aminés de départ et celle des groupes acylamino par la configuration des acides gras de départ. On peut partir d'un diamino acide de configuration L ou D ou racémique. On peut partir d'un acide aminé hydroxylé de configuration L, D ou racémique. Tous ces stéréoisomères ou diastéréoisomères font partie de l'invention.

Le procédé selon l'invention peut encore être défini par les modalités d'exécution suivantes actuellement préférées figurées aux Schémas de synthèse 1, 2 et 3 (Fig 33, 34 et 35):

1. Le blocage de la fonction amine en  $\omega$  sur la chaîne d'un dérivé d'ornithine est effectué par N-benzyloxycarbonylation après réaction initiale de la fonction acide avec un sel de cuivre, en milieu alcalin, réaction de ce carboxylate de cuivre avec du chloroformiat de benzyle et libération de la fonction carboxylique par chélation du cuivre en milieu acide, pour obtenir le dérivé N-benzyloxycarbonylé, selon une

méthode décrite dans « Organic Preparations and Procedures International 23 (1992) 191-194 ».

2. Le blocage de la fonction amine en  $\alpha$  du carboxyle du dérivé de l'ornithine est  
5 effectué par terbutyloxycarbonylation au moyen d'un pyrocarbonate d'alkyle  
comme le pyrocarbonate de terbutyle en milieu basique.  
Le pyrocarbonate de terbutyle réagit avec la fonction amine proximale pour former  
le dérivé  $\omega$ -benzyloxycarbonylamino  $\alpha$ -terbutyloxycarbonylamino carboxylique.
- 10 3. La conversion de la fonction carboxylique en fonction alcool primaire est réalisée  
en appliquant la méthode décrite dans Tetrahedron Letters 32 (1991) 923-926 qui  
consiste en ce que l'on fait réagir le dérivé carboxylique avec un chloroformiate  
d'alkyle, comme le chloroformiate d'isobutyle, pour former un anhydride mixte que  
15 l'on réduit au moyen d'un borohydrure de métal alcalin ou alcalino-terreux, pour  
conduire au dérivé hydroxylé correspondant, ayant une fonction alcool primaire.
4. L'élimination du groupe terbutyloxycarbonyl en  $\alpha$  est effectuée par action de  
l'acide trifluoroacétique qui conduit en même temps à la formation du  
trifluoroacétate de la fonction amine.  
20
5. L'acylation de la fonction amine ainsi libérée est effectuée au départ du sel  
trifluoroacétique au moyen d'un anhydride mixte préparé à partir de l'acide  $R_2OH$   
et d'un chloroformiate d'alkyle.
- 25 6. La libération de la fonction amine terminale est réalisée par hydrogénolyse en  
présence d'un catalyseur à base de métal noble comme le platine, le palladium  
sur charbon ou l'iridium.
- 30 7. Le couplage peptidique entre le composé aminé de formule II et le dérivé  
phosphorylé de formule III' est effectué en présence d'un agent de couplage tel  
que la 1-isobutyloxy 2-isobutyloxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine dans un solvant  
inerte tel qu'un solvant halogéné, ou en utilisant un carbodiimide.



On obtient ainsi un pseudodipeptide de formule générale (IV') dont la fonction hydroxyle éventuellement portée par le groupe acyle  $R_2$ , est bloquée.

8. La libération de la fonction hydroxyle du groupe acyle  $R_2$  intervient par hydrogénolyse en présence d'un métal noble comme le palladium, déposé sur un support comme le charbon.

9. La libération du groupe phosphorique est effectuée par hydrogénation catalytique en présence d'oxyde de métal noble comme l'oxyde de platine.

10. La phosphorylation du dérivé pseudodipeptique IV' est effectuée en deux étapes (Helv. Chim. Acta 70 (1987) 175). Dans une première étape le composé IV' est soumis à l'action d'un N, N-dialkyl phosphoramidite de dialkyle ou de diaryle, en présence d'un agent de couplage tel que le [1H]-tétrazole dans un solvant polaire tel que le tétrahydrofurane ; le phosphite ainsi formé est ensuite oxydé en phosphate à l'aide d'un acide peroxy-carboxylique aromatique comme par exemple l'acide peroxyphthalique, l'acide m-chloroperbenzoïque ou l'acide nitroperbenzoïque. La libération du groupe phosphorique Y (formule V) est réalisée par hydrogénation catalytique en présence d'un métal noble comme le palladium sur charbon.

11. La phosphorylation du dérivé de l'homosérine est effectuée à l'aide d'un halogénure de diphenylphosphoryle en présence de pyridine et d'une N, N-dialkylaminopyridine (Helv. Chim. Acta 58 (1975), 518), après blocage de la fonction amine par tertbutoxycarbonylation au moyen du pyrocarbonate de tertbutyle en milieu basique et blocage de la fonction carboxyle après formation d'un sel de césium, et benzoylation à l'aide d'un halogénure de benzyle dans le diméthylformamide ou le diméthylacétamide.

12. L'acylation de l'azote du dérivé d'homosérine s'effectue après déprotection de la fonction amine par l'acide trifluoroacétique pour obtenir le sel trifluoroacétique de l'amine, et réaction avec un anhydride mixte résultant de la réaction entre l'acide carboxylique  $R_1OH$  et un chloroformiate d'alkyle en présence d'une amine réactive telle que la N-méthylmorpholine.

L'invention concerne encore les produits intermédiaires de formule générale II et de formule générale III et III', sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères.

5

L'invention concerne encore les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I, sous forme neutre ou chargée, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

10

L'invention concerne plus particulièrement les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un sel d'un composé de formule générale I, avec une base minérale ou organique thérapeutiquement compatible.

15

L'invention concerne encore les compositions pharmaceutiques à base d'un composé de formule générale I, sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule pharmaceutique.

20

Parmi les formes pharmaceutiques envisagées on pourra citer celles qui conviennent pour la voie digestive, parentérale, par inhalation, topique, transdermique ou permuqueuse comme par exemple les comprimés, les dragées, les gélules, les solutés ou suspensions injectables, les aérosols, les gels, les emplâtres ou les solutés pénétrants.

25

De préférence les composés selon l'invention sont utilisés par la voie injectable sous forme de solutions ou de suspensions aqueuses, éventuellement neutralisées par une amine ou une hydroxyalkylamine.

30

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter. Ils sont présentés dans les Schémas de synthèse 1 à 6 (Fig 33 à 38).

**EXEMPLE I**

Acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque

1. N $\alpha$ -Terbutyloxycarbonyl-DL-homosérine

- 5 2 g d'homosérine (16.78 mmol) ont été dissouts dans 20ml d'eau et on additionne cette solution de 16.78ml de NaOH 1M et de 3.006g de carbonate de césium (9.23 mmol). Après 5 minutes d'agitation, la solution est refroidie dans un bain d'eau et de glace. On ajoute alors 60 ml de dioxane et du pyrocarbonate de terbutyle. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation dans un bain d'eau glacée pendant
- 10 une heure puis à température ambiante pendant 5 heures. Le solvant a été ensuite éliminé sous vide. Le résidu sec a été employé directement pour l'étape suivante.

2. N $\alpha$ -Terbutyloxycarbonyl-DL-homosérinate de benzyle

- Au résidu du stade 1, on ajoute 20 ml de diméthylformamide et on effectue
- 15 l'évaporation à siccité puis on additionne le milieu réactionnel de 60 ml de diméthylformamide et de 4.5 ml de bromure de benzyle (20.13 mmol). Il se forme alors un précipité blanc. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 16 heures. Le solvant a été ensuite chassé sous vide. Le résidu a été épuisé avec 2 fois 20 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavée avec de l'eau (20 ml) puis avec
- 20 une solution saline (20 ml) respectivement, puis séchée sur sulfate de magnésium anhydre. Le solvant est évaporé et le résidu est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

3. N $\alpha$ -Terbutyloxycarbonyl-O-(diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle

- Le résidu de l'étape précédente a été séché sous vide poussé puis dissout dans le
- 25 chlorure de méthylène (60 ml). On ajoute alors 4.11g de 4-diméthylaminopyridine (33.56 mmol) dans la solution, le mélange réactionnel a été agité pendant 10 minutes, et on ajoute alors 12 ml de pyridine et 6.95 ml de chlorophosphate de diphényle (33.56 mmol). La solution a été agitée à température ambiante pendant 18 heures puis lavée avec de l'acide chlorhydrique N (5 x 20 ml), de l'eau (30 ml) et par
- 30 une solution saline (30 ml). La phase organique a été séchée sur sulfate de magnésium anhydre, le solvant a été chassé sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie flash (hexane/acétate d'éthyle = 4 : 1). La fraction principale a été

concentrée et le résidu cristallisé. On obtient ainsi 7.49 g de produit phosphorylé soit un rendement de 82.4 %. Point de fusion : 63.5 - 64.0° C.

4. O-(Diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle

- 5 Le produit phosphorylé de l'étape précédente (7.88 g soit 15.4 mmol) a été dissout dans 15 ml d'acide trifluoroacétique et la solution a été maintenue sous agitation à température ordinaire pendant 2.5 heures. Le solvant a été alors chassé sous vide poussé, le résidu sec a été purifié par chromatographie flash (MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 10 : 1). La fraction principale a été concentrée et le résidu a été cristallisé à température ordinaire. On obtient ainsi 7.17 g de produit phosphorylé (rendement 88.9 %). Il est utilisé sans autre purification pour l'étape suivante.

5. 2-[l(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-(diphényloxyphosphoryloxy)-butanoate de benzyle

- 15 4.284 g (10.07 mmol) d'acide (R) 3-dodécanoyloxytétradécanoïque préparé selon la méthode décrite dans Bull. Chem. Soc. Jpn 60 (1987), 2205-2214, ont été dissouts dans 30ml de tétrahydrofurane et la solution a été mise à refroidir jusqu'à -15°C dans un bain de saumure glacée. On a alors ajouté 1.108 ml (10.07 mmol) de N-méthylmorpholine et 1.31 ml (10.07 mmol) de chloroformiate d'isobutyle. On a poursuivi l'agitation pendant 30 minutes. On a alors ajouté au mélange réactionnel 5.724 g (10.07 mmol) de O-(diphényloxyphosphoryl)-DL-homosérinate de benzyle dans un mélange de 30ml de tétrahydrofurane et de 5 ml de triéthylamine. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, le solvant a été chassé sous vide et on a ajouté 20 ml d'eau au résidu. Le mélange a été ensuite épuisé avec de l'acétate d'éthyle (2 x 30 ml). Les phases organiques ont été combinées, lavées successivement avec de l'eau (20 ml) et avec de la saumure (20 ml) et séchées sur sulfate de magnésium. Le solvant a été évaporé et le résidu a été purifié par chromatographie flash (hexane - acétate d'éthyle 2:1, R<sub>f</sub> = 0.29); rendement 7.455g soit 87,1 %. PF = 31,0° - 32,1°C. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ en ppm : 7.4-7.1 (m, 15H), 6.90 (2d, 1H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, NH), 5.3-5.1 (m, 3H), 4.7 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.4-2.1 (m, 4H), 1.6 (m, 4H), 1.4-1.1 (m, 34H), 0.9 (t, 6H). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm : 173.01, 171.08, 169.66, 150.18 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,C</sub>=7.1 Hz), 135.01, 129.60, 128.33, 128.14, 127.96, 125.21, 119.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>P,C</sub>=5.0 Hz), 70.69, 67.05,

65.19 (d,  $^2J_{P,C}=5.6$  Hz), 49.13, 40.97, 40.77 (2 diast.), 34.20, 33.98, 33.82, 31.70, 29.42, 29.34, 29.14, 28.94, 25.01, 24.77, 22.47, 13.91.

6. Acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque

On prépare une solution de l'ester benzylique obtenu à l'étape 5 (2.23 g soit 2.6 mmol) dans 300 ml de méthanol HPLC dans un ballon à trois tubulures et on y ajoute 1.0 g de charbon palladié à 10 % de palladium. On purge le contenu du ballon pour chasser l'air, sous vide, puis le ballon a été chargé avec de l'hydrogène sous pression atmosphérique.

Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 1 heure, le catalyseur a été ensuite éliminé rapidement par filtration sur membrane et le filtrat a été concentré pour fournir un sirop incolore. Celui-ci est homogène en chromatographie en couche mince et en RMN, et a été utilisé directement sans purification supplémentaire pour l'étape de couplage;  $R_f = 0.75$  (dichlorométhane - méthanol - triéthylamine, 10:1:0.5).  $^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 250 MHz),  $\delta$  en ppm : 7.4-7.1 (m, 10H), 6.85 (d, 1H, NH), 5.15 (m, 1H), 4.6 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.4-2.15 (m, 4H), 1.6 (m, 4H), 1.4-1.1 (m, 34H), 0.9 (t, 6H).  $^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 63 MHz),  $\delta$  en ppm: 173.35, 173.30 (2 diast.), 172.75, 170.37, 150.0 (d,  $^2J_{P,C}=7.5$  Hz), 129.55, 125.28, 119.71 (d,  $^3J_{P,C}=4.4$  Hz), 70.78, 65.65 (d,  $^2J_{P,C}=5.9$  Hz), 49.00, 40.77, 40.63 (2 diast.), 34.13, 33.86, 33.76, 31.59, 29.31, 29.25, 29.03, 28.82, 24.88, 24.68, 22.36, 13.76.

L'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]butanoïque peut être obtenu par la même séquence de réactions en remplaçant dans l'étape 5 de l'exemple I, l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque par l'acide (R)-3-benzyloxytétradécanoïque.

**EXEMPLE II**

(2R)-5-amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol

1. Sel de cuivre de la D-ornithine

A une solution de D-ornithine (5.25 g soit 30 mmol) dans 30 ml d'hydroxyde de sodium M, on a ajouté 50 ml d'une solution de sulfate cuivrique pentahydraté (3.814 g soit 15.3 mmol) dans de l'eau. L'agitation a été poursuivie pendant 2 heures. On évapore alors le solvant à siccité. On ajoute 60ml de méthanol pour former un solide de couleur pourpre que l'on sépare, lave au dioxane et au méthanol respectivement.

### 2. (2R)-2-Amino-5-(benzyloxycarbonylamino) pentanoate de cuivre

Le solide pourpre a été dissout dans 40 ml de soude M et 70 ml de dioxane, la solution a été refroidie dans un bain d'eau glacée et on y ajoute 5.14 ml (soit 36 mmol) de chloroformiate de benzyle. L'agitation est poursuivie dans un bain d'eau glacée pendant 3 heures et ensuite à température ordinaire pendant 15 heures. Le précipité pourpre est rassemblé puis lavé à l'éthanol à 95 % (40 ml), à l'eau (50 ml) et à l'éthanol (60 ml) respectivement. Le précipité a été séché à l'étuve ( $T < 45^{\circ} \text{C}$ , sous vide); le rendement en deux étapes est de 8.27 g, soit 93 % par rapport à la théorie.

### 3. Acide (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)pentanoïque

Le sel de cuivre obtenu au stade 2 a été dissout dans de l'acide chlorhydrique 2M (400 ml) et on y a ajouté de l'EDTA (8.15 g, 27.8 mmol). On agite le mélange pendant 2.5 heures, puis on le neutralise à pH7 en ajoutant de la soude 5M (environ 160 ml). Il se forme un précipité blanc. Le mélange a été agité pendant 2.5 heures dans un bain d'eau glacée. Le précipité a été filtré, lavé à l'eau froide jusqu'à ce que l'effluent soit incolore, puis séché à l'étuve en dessous de  $60^{\circ}$ . Ce solide a été dissout dans 156ml de NaOH M et la solution refroidie au bain d'eau glacée. On a ajouté à cette solution 7.7g (35.2 mmol) de pyrocarbonate de terbutyle dans le dioxane (160 ml). Le mélange réactionnel a été agité à  $0^{\circ} \text{C}$  pendant 45 minutes puis pendant 16 heures à température ambiante. Le solvant organique a été évaporé et on ajoute au résidu 70ml d'acétate d'éthyle. On acidifie ensuite la phase aqueuse en ajoutant de l'acide chlorhydrique 2N jusqu'à pH  $\sim 3$ . La couche aqueuse a été épuisée encore une fois avec 100 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été combinées et lavées à l'eau (30 ml) et avec une solution saline (30 ml). Le solvant a été éliminé sous vide de façon à fournir une huile incolore après

purification par chromatographie flash (Rdt : 8.42g en deux étapes soit 76.7 % de la théorie) (Rf = 0.19, dichlorométhane - MeOH 20 : 1).

4. (2R)-5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)pentan-1-ol

- 5 A une solution froide (-15° C) du dérivé de l'acide diamino pentanoïque obtenu au stade 3 (5.45 g soit 14.8 mmol) dans 60ml de THF, on a ajouté 1.654 ml (soit 14.8 mmol) de N-méthylmorpholine et 9,6ml (soit 14.8 mmol) de chloroformiate d'isobutyle (IBCF). La solution a été agitée à -15° C pendant 1 minute puis on y a ajouté une solution de borohydrure de sodium (5.104 g soit 44.6 mmol) dans 10 ml d'eau. L'agitation a été maintenue à -15° C pendant encore 10 minutes puis on a ajouté 400 ml d'eau pour arrêter la réaction. La solution a été épuisée avec de l'acétate d'éthyle (100 ml x 2). Les phases organiques ont été combinées et lavées avec 50 ml d'eau et avec 60 ml de solution saline puis séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Le solvant a été chassé et le résidu a été cristallisé du mélange acétate d'éthyle/hexane (4.94 g, rendement 94.9 %) PF = 47.5 - 48° C.

5. Déblocage du dérivé du 2,5-diaminopentane-1-ol

- 6.32 g (18 mmol) de (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-(terbutyloxycarbonylamino)-pentan-1-ol obtenu au stade 4 ont été dissouts dans 25 ml d'acide trifluoroacétique puis agités pendant 2.5 heures à température ambiante. Le solvant a été ensuite évaporé et le résidu a été purifié par chromatographie flash (MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 10:1). On obtient ainsi une masse vitreuse incolore qui fond à température ambiante. Le rendement est de 5.45 g de sel trifluoroacétique (rendement = 82.7 %). Le chlorhydrate fond à 133.0 - 134.3° C (recristallisation du méthanol).

6. (2R)-5-(Benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol

- On a ajouté à une solution refroidie à -15° C de 5.27 g (15.8 mmol) d'acide (R)-3-benzyloxytétradécanoïque (Bull. Chem. Soc. Jpn, 60 (1987), 2197-2204) dans 30 ml de tétrahydrofurane, 1.89 ml (15.8 mmol) de N-méthylmorpholine et 2.21 ml d'IBCF (15.8 mmol). Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation à -15° C pendant 30 minutes. On ajoute alors 5.25 g de sel trifluoroacétique de l'exemple précédent (14.4 mmol) dans 30 ml de tétrahydrofurane et 1.44 ml de triéthylamine à la solution. L'agitation a été poursuivie à température ambiante pendant 16 heures puis on a

ajouté 30ml d'eau et 60ml d'acétate d'éthyle; la phase organique a été séparée et la phase aqueuse a été épuisée une fois encore avec de l'acétate d'éthyle (60 ml). Les phases organiques ont été combinées et lavées à l'eau (30 ml) et avec une solution saline (30 ml) puis séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Le solvant a été évaporé et le résidu a été recristallisé d'un mélange acétate d'éthyle/hexane (5.824 g, soit un rendement de 71,2 %), PF = 117,5°- 118° C. Rf = 0.32, acétate d'éthyle - éther de pétrole 3:1. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ en ppm : 7.4-7.2 (m, 10H), 6.5 (d, 1H, NH), 5.1 (s, 2H), 4.9 (m, 1H, NH), 4.5 (2d, AB, 2H), 3.8 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 3.1 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 1.6-1.4 (m, 6H), 1.4-1.2 (m, 18H), 0.9 (t, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm : 172.24, 156.49, 138.06, 136.53, 128.46, 128.04, 127.87, 76.76, 71.39, 66.60, 65.44, 51.54, 41.43, 40.65, 33.76, 31.87, 29.61, 29.30, 28.01, 26.47, 25.05, 22.65, 14.09.

#### 7. (2R)-5-Amino-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol

Dans un ballon à trois tubulures, 150 mg de palladium sur charbon à 20 % ont été ajoutés à la solution de (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino] pentan-1-ol (3.0 g, soit 5.27 mmol) et 6ml de triéthylamine dans 300 ml d'éthanol HPLC. On a chassé l'air par mise sous vide puis le ballon a été chargé d'hydrogène. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 2 heures puis le catalyseur a été séparé par filtration sur membrane et le filtrat a été concentré pour fournir un solide blanc homogène en CCM, utilisé tel quel pour le stade suivant sans autre purification. Rf = 0.2, dichlorométhane - méthanol - triéthylamine 5:1:0.5, PF = 47 - 48°C.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ en ppm: 7.4-7.2 (m, 5H), 6.75 (d, 1H, NH), 4.5 (2d, AB, 2H), 3.9 (m, 2H), 3.5 (m, 2H), 2.3 - 2.6 (m, 7H), 1.7-1.2 (m, 24H), 0.9 (t, 3H). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm: 171.86, 138.13, 128.37, 127.87, 127.75, 76.81, 71.50, 64.57, 51.38, 41.51, 41.17, 33.89, 31.82, 29.26, 28.57, 28.03, 25.07, 22.60, 14.04.

Le (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol peut être obtenu par la même séquence de réactions en remplaçant dans l'étape 6 de l'exemple II, l'acide (R)-3-benzyloxytétradécanoïque par l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque.



**EXEMPLE III**3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décane-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate1. Couplage Peptidique

On disperse dans une solution d'acide (2RS)-4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]butanoïque (1.0 mmol) obtenu à l'exemple I, dissous dans 20ml de chlorure de méthylène, 363.6 mg (1.2 mmol) d'IIDQ (1-isobutyloxy-2-isobutyloxycarbonyl-1,2-dihydroquinoléine). On ajoute après 15 minutes d'agitation 1.0 mmol de (2R)-5-amino-2-[(R)-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol obtenu à l'exemple II, dissout dans 10 ml de chlorure de méthylène et le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation pendant 4h.

La solution a été concentrée et le résidu purifié par chromatographie flash ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / acétone = 5:2, Rf 0.23). Le solvant a été chassé et on obtient ainsi un sirop incolore (0.620 g soit un rendement de 52.7 %) de pseudodipeptide phosphorylé. Rf = 0.49, dichlorométhane - méthanol - triéthylamine, 10:1:0.5.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$  en ppm: 7.40-7.15 (m, 15H), 7.00 (m, 1H), 6.90 et 6.80 (2d, 2 diast, 1H), 6.65 (d, 1H) (3 x NH), 5.15 (m, 1H), 4.50 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.41-2.14 (m, 8H), 1.6-1.4 (m, 8H), 1.4-1.1 (m, 54H), 0.9 (t, 9H,  $3\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  en ppm : 173.11, 171.68, 170.52 (2 diast.), 169.94 (2 diast.), 150.0 (d,  $^2J_{\text{P,C}}=7.2$  Hz), 138.20 (2diast.), 129.58, 127.99, 127.49, 127.26, 125.24, 119.73 (t,  $^3J_{\text{P,C}}: 5.0$  Hz), 76.48, 71.12, 70.71, 65.86 (élargi), 64.22, 50.96, 49.71 (élargi), 41.46, 41.05, 39.07, 34.13, 34.00, 32.70, 31.61, 29.34, 29.06, 28.87, 27.98, 25.25 24.92, 24.72, 22.38, 13.80.

2. 1-(Diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]décane-10-ol.

La solution de pseudodipeptide phosphorylé (488 mg soit 0.42 mmol) obtenu ci-dessus et d'acide acétique (1.9 ml) dans 65 ml d'éthanol HPLC a été placée dans un ballon à trois tubulures et on y ajoute 200 mg de palladium sur charbon à 10 % de Pd. On purge l'air par mise sous vide puis le ballon a été chargé avec de

l'hydrogène. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 2h, puis le catalyseur a été séparé par filtration sur membrane, le solvant a été chassé sous vide, ce qui fournit le produit brut avec un rendement de 92%. Un échantillon de produit est purifié par chromatographie flash (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / acétone 5:4, R<sub>f</sub> = 0.24). On obtient ainsi un solide vitreux. R<sub>f</sub> = 0.68, chlorure de méthylène - méthanol 5:2. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ en ppm (quelques signaux dédoublés par la présence de diastéréoisomères) : 173.60, 173.15, 170.67, 170.60, 170.27, 170.07, 150.24 (d), 129.92, 125.66, 120.05 et 119.90 (2d), 71.11, 71.05, 68.83, 66.21 (élargi), 64.71, 51.38, 50.32, 50.12, 43.25, 43.12, 41.66, 41.57, 39.30, 37.26, 34.45, 32.84, 31.86, 29.62, 29.5, 29.29, 29.13, 28.08, 25.57, 25.19, 24.97, 22.62, 14.03.

### 3. 3-[(R)-3-Dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate

Dans un ballon à trois tubulures, on préactive de l'oxyde de platine (137 mg) dans de l'éthanol absolu (5 ml) avec de l'hydrogène pendant 10 min. On ajoute ensuite la solution de 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino] décan-10-ol (411 mg soit 0,38 mmol) dans de l'éthanol absolu (20 ml). On chasse l'air par mise sous vide poussé, puis le ballon a été chargé avec de l'hydrogène. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 2 à 3 h, le catalyseur a été séparé par filtration sur membrane, le solvant chassé sous vide. On obtient finalement le produit brut sous la forme d'un solide blanc (rendement brut de 98%). R<sub>f</sub> = 0.50, chloroforme - méthanol - eau, 6:4:0.6.

Le 3-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate peut être obtenu à partir de l'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]butanoïque et du (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol par la même séquence de réactions (Schéma 3) (Fig 35).

Alternativement, le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1-dihydrogénophosphate est obtenu à partir de l'acide aspartique par la séquence de réactions suivantes (Schémas de

synthèse 1, 5 et 6) (Fig 33, 37 et 38): protection de la fonction OH libre du (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol par un groupement benzyloxyméthyle, libération de la fonction 5-amino de ce composé par hydrogénolyse, couplage peptidique de cette amine avec un dérivé monoestérifié de l'acide D ou L-aspartique portant sur sa fonction amine soit un groupe protecteur soit un groupe (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyle, libération et réduction de la fonction carboxylique terminale par l'intermédiaire d'un anhydride mixte, déprotection si nécessaire de la fonction amine issue de l'acide aspartique puis N-acylation avec un dérivé de l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque, phosphorylation de la fonction hydroxyle en C-1, et finalement déblocage des fonctions phosphate et hydroxyles par hydrogénolyse.

#### EXEMPLE IV

Préparation du 3-[(R)-3-dodécanoyl-oxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]décane-1,10-diol, 1,10-bis(dihydrogénophosphate).

Le 1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]décan-10-ol (985 mg soit 0.84 mmol) est traité avec du N,N-diéthylphosphoramidite de dibenzyle (0.58 ml, pureté 85%), en présence de [1H]-tétrazole (182 mg) dans le tétrahydrofurane (35 ml) pendant 30 min à température ambiante. Le phosphite intermédiaire est oxydé par addition d'une solution d'acide m-chloroperoxybenzoïque (535 mg) dans 25 ml de chlorure de méthylène entre 0° et -20°C. Après 20 min, on ajoute une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (20 ml) pour détruire l'excès d'oxydant, puis on dilue la phase organique avec de l'éther. La phase organique est séparée, lavée successivement avec une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (5 x 20 ml), puis une solution de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 ml), puis avec de l'acide chlorhydrique aqueux (20 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub> et concentrée. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - acétone 10:3). Le dérivé diphosphorylé protégé ainsi obtenu (900 mg, rendement 75%)(R<sub>f</sub> 0.64, dichlorométhane - acétone 5:2) est soumis à une hydrogénation catalytique dans le méthanol HPLC (100 ml) en présence de palladium sur charbon à 10% de palladium (300 mg) sous pression atmosphérique, pendant 4h à température ambiante. Le catalyseur est éliminé par filtration sur membrane et le filtrat concentré sous pression réduite, ce qui fournit le 10-(dihydroxyphosphoryloxy)-1-(diphényloxyphosphoryloxy)-3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-

hydroxytétradécanoylamino]décane brut ( $R_f = 0.63$ , chloroforme-méthanol-eau 6:4:0.6) avec un rendement de 89%. Ce produit est ensuite soumis à une hydrogénation catalytique sur oxyde de platine (380 mg) dans l'éthanol HPLC (130 ml) pendant 24h à température ambiante, sous pression atmosphérique. Le catalyseur est éliminé par filtration sur membrane et le filtrat concentré pour fournir composé bis dihydrogénophosphate libre ( $R_f = 0.20$ , chloroforme - MeOH - eau, 6:4:0.6).

Le 3-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1,10-bis(dihydrogénophosphate) peut être obtenu à partir de l'acide 4-(diphényloxyphosphoryloxy)-2-[(R)-benzyloxytétradécanoylamino]butanoïque et du (2R)-5-amino-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol par la même séquence de réactions (Schéma 3) (Fig 35).

Alternativement, le 3-[(R)-3-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]-décan-1,10-diol 1,10-bis(dihydrogénophosphate) est obtenu à partir de l'acide aspartique par la séquence de réactions suivantes (Schémas de synthèse 1, 4 et 6): libération de la fonction 5-amino du (2R)-5-(benzyloxycarbonylamino)-2-[(R)-3-benzyloxytétradécanoylamino]pentan-1-ol par hydrogénolyse, couplage peptidique de cette amine avec un dérivé monoestérifié de l'acide D ou L-aspartique portant sur sa fonction amine soit un groupe protecteur soit un groupe (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoyle, libération et réduction de la fonction carboxylique terminale par l'intermédiaire d'un anhydride mixte, déprotection si nécessaire de la fonction amine issue de l'acide aspartique puis N-acylation avec un dérivé de l'acide (R)-3-dodécanoyloxytétradécanoïque, phosphorylation des fonctions hydroxyles en C-1 et en C-10, et finalement déblocage des fonctions phosphates et hydroxyle par hydrogénolyse.

## EXEMPLE V - PURIFICATION ET ANALYSE DES COMPOSES SELON L'INVENTION

### 1. Purification des composés monophosphorylé et diphosphorylé

Les produits de synthèse monophosphorylé et diphosphorylé sont solubilisés dans un mélange eau - isopropanol (1:1 v/v) avec 0.1% de triéthylamine pour obtenir un pH entre 8 et 9. La quantité nécessaire de bicarbonate d'ammonium 2M est ensuite ajoutée pour atteindre une concentration de 25 mM.

La purification est effectuée par HPLC préparative en phase inverse dans les conditions suivantes :

Colonne:	Bondapack C18 PrepPak, 40 x 200 mm, 15-20 µm, 300 Å, Waters
Phase mobile:	A: isopropanol - eau (1:1, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium B: isopropanol - eau (2:8, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium
Débit:	40 ml/min
Elution:	Adsorption isocratique sur la colonne : 40% B (60% A), 10 minutes Gradient A:B : 40 à 80% B en 10 minutes Elution isocratique 80% B, 30 minutes Lavage : 100% B, 10 minutes
Détection:	UV, 210 nm

Dans ces conditions d'élution, le temps de rétention du composé monophosphorylé est compris entre 25 et 30 min et celui du composé diphosphorylé entre 18 et 25 minutes. Au cas où la présence de produits monophénylés serait observée (déprotection incomplète lors de la déphénylation finale), une purification plus fine doit être effectuée. Cette purification supplémentaire est réalisée dans les conditions suivantes :

Colonne:	Kromasil C18, 21 x 250 mm, 5 µm, 100 Å, Macherey-Nagel
Phase mobile:	A: isopropanol - eau (1:1, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium B: isopropanol - eau (2:8, v/v), 50mM bicarbonate d'ammonium
Débit:	10 ml/min

Elution: Adsorption isocratique sur la colonne: 40% B (60% A), 10 minutes

Elution isocratique :

composé monophosphorylé : 80% B, 30 minutes

composé diphosphorylé : 74% B, 30 minutes

5 Lavage : 100% B, 10 minutes

Détection: UV, 210 et 254 nm

Les fractions contenant les composés monophosphorylé ou diphosphorylé sous forme de sel d'ammonium sont rassemblées et concentrées par adsorption sur phase C18 Bondapack, 15-20 µm, 300 Å, Waters. Le sel de sodium des composés monophosphorylé ou diphosphorylé est obtenu par lavage au moyen d'une solution à 10 g/L NaCl dans l'eau - isopropanol (9:1, v/v). Après élimination de l'excédent de NaCl par passage de 5 volumes d'un mélange eau - isopropanol (9:1, v/v) sur la colonne, le composé est élué avec de l'isopropanol pur. Ce solvant est ensuite évaporé à sec au Rotavapor. Une solubilisation finale est réalisée dans le volume nécessaire d'eau (additionnée de 0.1 % de triéthanolamine dans le cas du composé monophosphorylé) pour atteindre une concentration cible de 2 mg/ml. Une filtration stérilisante est ensuite effectuée sur filtre 0.2 µm, Express Membrane, Millipore (si volume inférieur à 50 ml: système Steriflip, si volume supérieur à 50 ml: système Steritop).

20 Dans le cas du composé monophosphorylé, une sonication de la solution (3 fois 10 secondes) à température ambiante est effectuée avant la filtration stérilisante.

## **2. Suivi et rendement de la purification**

Après chaque étape, les fractions sont analysées par chromatographie analytique

25 HPLC en phase inverse selon les conditions suivantes :

Colonne: Supelcosil C18, 3 µm, 4.6 x 150mm, 100 Å, Supelco

Phase mobile: A: eau - acétonitrile (1:1, v/v), 5mM TBAP

B: eau - isopropanol (1:9, v/v), 5mM TBAP

TBAP : phosphate de tétrabutylammonium

30 Débit: 1 ml/min

Elution: Gradient A:B (75:25 à 0:100) en 37.5 minutes

Détection: UV, 210 et 254 nm

Dans ces conditions chromatographiques, les temps de rétention observés pour les composés mono- et diphosphorylés sont de  $25.5 \pm 0.5$  et  $20.8 \pm 0.5$  minutes, respectivement. Les rendements de purification obtenus varient entre 57 et 94% pour le composé monophosphorylé et entre 71 et 92% pour le composé diphosphorylé. 311 mg et 189 mg de composés mono et diphosphorylé, respectivement, ont été produits.

### 3. Dosage et analyse de pureté des produits finaux

Le dosage et le contrôle de pureté des produits obtenus sont réalisés par HPLC/UV dans les conditions chromatographiques décrites ci-dessus. Selon ces analyses les puretés obtenues pour les différents lots de composés mono- et diphosphorylés produits varient entre 99 et 100%. Afin de mettre en évidence la présence d'impuretés inactives en UV, des analyses LC/ES-MS ont été réalisées (ionisation de type electrospray, mode positif). Pour ces dernières, le phosphate de tétrabutylammonium (5 mM) a été remplacé par l'acétate d'ammonium (25 mM) pour satisfaire aux conditions d'ionisation de l'interface electrospray.

Des méthodes alternatives de dosage des solutions finales ont été utilisées. On citera pour exemple l'analyse quantitative des phosphates totaux (adapté de Ames, B.N., Methods in Enzymology VII (1966), 115-117), des acides aminés (adapté de Hughes et al., J. Chromatogr. 389 (1987), 327-333) et des chaînes acyles (adapté de Miller, L.T., Hewlett-Packard Application Note (1984), 228-237).

### 4. Analyses spectroscopiques

#### 4.1. Spectrométrie de masse

Les spectres ES-MS (modes positif et négatif) des composés mono- et diphosphorylés ont été mesurés sur trois types de spectromètres de masse (Finnigan LCQ, ion trap; Micromass Quattro II, triple stage quadrupole; Hewlett-Packard MSD, single quadrupole). Des analyses complémentaires de type MS/MS ont également été réalisées. Les spectres attestant de l'identité et de la pureté des produits sont joints en annexe.

Spectres ES-MS (mode positif)Composé diphosphorylé :

(Micromass Quattro II : Spectre 1; HP-MSD : Spectre 3) (Fig 39 et 41)

A basse énergie, un ion pseudomoléculaire majoritaire à  $m/z$  1014.6  $[M+H]^+$  est observé. Des adduits de sodium à  $m/z$  1036.6  $[M+Na]^+$ , 1058.6  $[M-H+2Na]^+$  et 1080.5  $[M-2H+3Na]^+$  sont également visibles.

Selon le degré de fragmentation choisi, deux fragments à  $m/z$  916.5  $[M-98+H]^+$  et 818.6  $[M-98+H]^+$  sont observés, attestant de la présence de deux groupes phosphoryles sur la molécule. Comme le montre le spectre 3 (Fig 41), l'intensité relative des ions observés varie considérablement en fonction de l'énergie appliquée.

Composé monophosphorylé :

(Micromass Quattro II : Spectre 2) (Fig 40)

Un schéma d'ionisation quelque peu différent est obtenu pour le composé monophosphorylé du fait de la présence de triéthanolamine (TeoA) dans les solutions analysées. On observe un ion pseudomoléculaire majoritaire à  $m/z$  934.4  $[M+H]^+$  ainsi que des adduits de sodium  $[M+Na]^+$  et de potassium  $[M+K]^+$  à  $m/z$  956.3 et 972.3, respectivement. Un second groupe d'adduits à  $m/z$  1083.4  $[M+TeoA+H]^+$ ,  $m/z$  1105.3  $[M+TeoA+Na]^+$  et  $m/z$  1121.3  $[M+TeoA+K]^+$  est également visible. La présence d'un groupe phosphoryle sur la molécule est confirmée par un fragment observé à haute énergie à  $m/z$  836.4  $[M-98+H]^+$ .

Spectres ES-MS (mode négatif)

Les ions observés sur les spectres ES-MS des composés mono- et diphosphorylés en mode négatif sont tout à fait en accord avec les résultats obtenus en mode positif.

Des analyses en ionisation FAB (mode positif) ont également été réalisées. A basse résolution, les composés mono- et diphosphorylés présentent des adduits de sodium  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  956.5 et 1036.5, respectivement.

A haute résolution (matrice d'alcool 3-nitro benzylique), un pic à  $m/z$  956.667 est observé pour le monophosphate, ce qui correspond à la formule brute  $C_{49}H_{96}O_{11}N_3PNa$  attendue (masse calculée : 956.668 uma).



Pour le diphosphate, un pic à  $m/z$  1036.635 est mesuré, ce qui correspond à la formule brute  $C_{49}H_{97}O_{14}N_3P_2Na$  attendue (masse calculée : 1036.634 uma).

Toutes les analyses MS ont mis en évidence le haut degré de pureté des produits  
5 obtenus.

#### 4.2. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres  $^1H$ -RMN et  $^{13}C$ -RMN des composés mono- et diphosphorylés ont été mesurés sur des appareils de type Bruker DPX à 250.13 et 62.89 MHz, respectivement, et Varian Unity Inova 500 à 499.87 et 125.7 MHz, respectivement.  
10 Les spectres  $^{31}P$ -RMN ont été enregistrés à 121.6 MHz (Bruker DPX). Les spectres attestant de l'identité et de la pureté des produits sont joints en annexe.

#### Spectres $^1H$ -RMN (Spectres 4 et 5) (Fig 42 et 43)

15 - composé monophosphorylé : sur le spectre enregistré dans  $CDCl_3$  + 0.1% triéthanolamine (TEoA) (Spectre 4), on observe les signaux correspondant aux trois protons portés par les atomes d'azote N(5), N(2a) et N(2b) entre 7 et 9.5 ppm (voir agrandissement de la fenêtre spectrale). Les signaux attribués à H-N(2a) et H-N(2b) apparaissent sous la forme de deux doublets qui mettent en évidence la  
20 présence d'un mélange de stéréoisomères. On observe également une prédominance de l'un des diastéréoisomères (conséquence des différentes étapes de purification).

- composé diphosphorylé : sur le spectre enregistré dans  $CDCl_3$ - $CD_3OD$  (3:1, v/v) (Spectre 5), les signaux correspondant à H-N(5), H-N(2a) et H-N(2b) ne sont plus  
25 observés suite à un échange en présence de  $CD_3OD$ .

Des informations supplémentaires pour l'attribution des différents signaux ont été obtenues par des expériences de corrélations homo- et hétéronucléaires ( $^1H$ - $^1H$  - RMN: COSY,  $^1H$ - $^{13}C$ -RMN: HSQC et HMBC).

#### Spectres $^{13}C$ -RMN (Spectres 6 et 7) (Fig 44 et 45)

30 L'enregistrement de spectres  $^{13}C$ -RMN est rendu particulièrement difficile par la solubilité relativement faible des composés mono- et diphosphorylés.

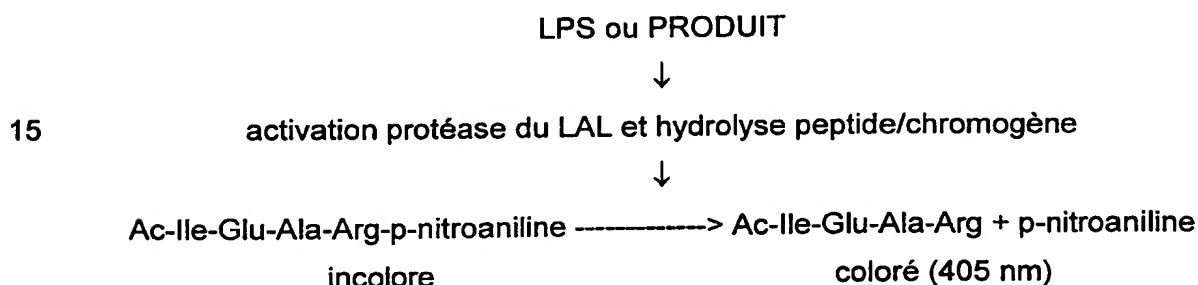
#### Spectres $^{31}P$ -RMN (Spectres 8 et 9) (Fig 46 et 47)

Pour les deux composés mono- et diphosphorylés, un pic unique est observé.

## EXEMPLE V - ETUDES PHARMACOLOGIQUES DES COMPOSES SELON L'INVENTION

### 1. Détermination de l'endotoxicité par le test chromogénique au *Limulus*.

- 5 L'endotoxicité est déterminée par le test *Limulus Amoebocyte Lysate* chromogénique (LAL-Chromogénique de Charles River Endosafe , lot # EK4121E, Charleston, USA). Ce test est basé sur l'activation par le lipopolysaccharide (LPS) ou les produits de structure comparable, d'une cascade enzymatique présente dans le LAL. Cette activation enzymatique est mise en évidence par le clivage d'un chromogène lié à un
- 10 peptide par la protéase, en bout de chaîne de la cascade enzymatique selon la réaction suivante :



- 20 La réaction enzymatique est effectuée à 37° C et la formation du chromogène au cours du temps est mesurée à 405 nm. Dans cette méthode cinétique en point final, le temps nécessaire pour atteindre 0.2 unités de DO est enregistré et l'activité endotoxique calculée par rapport à un étalon de LPS (courbe standard).
- 25 Les résultats sont exprimés en EU (Endotoxin Unit) par rapport à une préparation standardisée de lipopolysaccharide de *E. coli*. Pour cette série de dosage 1 EU correspond à 0.08 mg d'équivalent LPS.
- Les résultats présentent une variabilité relativement importante mais normale pour ce genre de dosage quantitatif qui donne surtout un ordre de grandeur. Le test LAL
- 30 est surtout utilisé pour démontrer l'absence de pyrogène (limite supérieure de la concentration en endotoxine) dans des préparations pharmaceutiques. Le dosage quantitatif du contenu en pyrogène doit impérativement être comparé dans une même série d'expériences bien standardisées.

**Résultats**

Les résultats (moyennes  $\pm$  écart-type) obtenus pour les produits de l'invention sont présentés dans le Tab (a):

## 5 Tab (a) Activation du limulus amebocyte lysat (LAL)

Produits	Activité LAL en EU/mg	Activité LAL en équivalent LPS ng éq. LPS/mg
OM-294-DP	$56 \pm 48$	6.2
OM-294-MP	$13 \pm 2$	1.4
LPS de <i>E. coli</i> (référence)	$7.7 \pm 1.6 \times 10^6$	$0.85 \times 10^6$

Les composés selon l'invention sont  $10^6$  fois moins actifs que le LPS dans le test LAL. L'OM-294-DP et l'OM-294-MP sont donc des produits particulièrement intéressants du fait de leur faible toxicité, associée à leur capacité à induire des activités biologiques immunomodulatrices (*in vivo* et *in vitro*).

## **2. Détermination de la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse de souris stimulées par du LPS ou par les composés de l'invention**

**Protocole**

15 2 souris mâles C57/BL6 de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub> suivie d'une dislocation des cervicales. Les souris sont lavées à l'alcool, et la peau des membres postérieurs est retirée complètement. Les hanches, les fémurs et les tibias sont détachés au niveau des articulations. Les chairs sont enlevées grossièrement avec un scalpel. Les os sont nettoyés et les extrémités des os sont coupées au

20 ciseau. La moelle est extraite de la lumière osseuse par injection en 3 fois de 1ml de milieu Eagle modifié par Dulbecco (milieu DH) par les extrémités qui ont été coupées au ciseau. Les cellules sont remises en suspension dans le milieu DH et centrifugées pendant 5 minutes à 300 x g. Le surnageant est éliminé et les cellules souches sont remis s en suspension dans du milieu DH complété avec 20 % de

25 sérum foetal (FCS). La concentration cellulaire est ajustée à 500'000 cellules par ml.

Les produits en solution dans le milieu DH supplémenté avec le FCS, les acides aminés et les antibiotiques sont dilués en série, directement dans la microplaque à 96 puits. 9 dilutions sont effectuées avec un facteur de 3.16. Les produits sont testés en sextuplicate et chaque microplaque comprend un témoin négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100  $\mu$ l. Les microplaques sont incubées pendant 1 heure à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité pour tamponner le milieu. Après 1 heure, 100  $\mu$ l de la suspension cellulaire sont ajoutés aux produits et l'incubation est poursuivie pendant 7 jours.

La prolifération est déterminée par la mesure de l'oxydation d'un substrat chromogénique (XTT) dans les mitochondries des cellules vivantes.

Après 7 jours les microplaques sont centrifugées 5 minutes à 400 x g, et 100  $\mu$ l de surnageant sont prélevés et éliminés. 50  $\mu$ l d'une solution à 1 mg/ml de XTT 3-[1-phénylamino-carbonyl)-3,4-tétrazolium]-bis[(4-méthoxy-6-nitro)benzène sulfonate] de sodium et 0,008 mg/ml PMS ((N-méthyl dibenzopyrazine, méthyl sulfate) dans du milieu RPMI sont ajoutés à chaque puits. Après 8 heures d'incubation à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité, les microplaques sont lues au spectrophotomètre à 490 nm contre une référence à 690 nm.

Les résultats sont exprimés en moyenne ( $\pm$  écart type) sous forme d'une courbe dose/réponse. Les valeurs du contrôle négatif composé de milieu DH (moyenne  $\pm$  écart type de toutes les expériences) sont également indiquées sous forme graphique.

Dans cette expérience les composés selon l'invention induisent une prolifération significative des cellules-souches de moelle de souris. Celle-ci est presque aussi importante que celle induite par le LPS de *E. coli*, mais la concentration minimale nécessaire pour induire une réponse significative est supérieure. Le produit monophosphorylé induit une réponse plus faible que celle du produit diphosphorylé.

La figure 1 représente une expérience représentative tirée d'un ensemble de 3 expériences indépendantes obtenues à partir de préparations cellulaires différentes.

### **3- Détermination de la production d'oxyde nitrique dans les surnageants de macrophages**

#### ***Protocole***

Deux souris C57/BL6 mâles de 6 semaines sont sacrifiées par inhalation de CO<sub>2</sub> suivie d'une dislocation des cervicales. Les souris sont lavées à l'alcool, et la peau des membres postérieurs est retirée complètement. Les hanches, les fémurs et les tibias sont détachés au niveau des articulations. Les chairs sont enlevées grossièrement avec un scalpel. Les os sont nettoyés et les extrémités des os sont coupées aux ciseaux. La moelle est extraite par injection en 3 fois de 1ml de milieu Eagle modifié par Dulbecco (milieu DH) dans la lumière osseuse. Les cellules sont remises en suspension dans le milieu DH et centrifugées pendant 5 minutes à 300 x g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension à la concentration de 40'000 cellules/ml dans du milieu DH complété avec 20 % de sérum de cheval (HS) et 30 % de surnageant de L929. Les L929 sont une lignée de fibroblastes murins dont le surnageant est riche en facteur de croissance pour les macrophages (M-CSF). La suspension cellulaire est distribuée par 12 ml dans des boîtes de Pétri qui sont incubées pendant 8 jours à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité. Après 8 jours, les cellules-souches se sont différenciées en macrophages matures. Les macrophages sont détachés par une incubation de 45 minutes à 4° C dans du PBS froid. Après centrifugation et élimination, les cellules sont remises en suspension dans du milieu DH complété avec 5 % de sérum foetal (FCS), de la glutamine, de l'asparagine, de l'arginine, de l'acide folique, du mercaptoéthanol et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules souches sont rassemblées et la concentration cellulaire est ajustée à 700'000 cellules par ml.

Les produits mis en solution dans le milieu DH supplémenté avec FCS, les acides aminés et les antibiotiques sont dilués en série directement dans la microplaque à 96 puits. 9 à 10 dilutions suivant les produits sont effectués avec un facteur de 3.16. Les produits sont testés en triplicate et chaque microplaque comprend un témoin négatif composé de milieu seul. Le volume final dans chaque puits est de 100 µl. Les microplaques sont incubées pendant 1 heure à 37° C sous 8 % CO<sub>2</sub> dans une étuve saturée en humidité pour tamponner le milieu. Après 1 h ure, 100 µl de la

suspension cellulaire sont ajoutés aux produits et l'incubation est poursuivie pendant 22 heures.

Après 22 heures les microplaques sont centrifugées, 5 minutes à 400 x g et 100 µl de surnageant sont prélevés et transférés dans une microplaque. 100 µl de réactif de Griess [5 mg/ml de sulfanilamide + 0.5 mg/ml de chlorhydrate de N-(1-naphthyléthylène diamine)] dans de l'acide phosphorique à 2.5 % aqueux, sont ajoutés à chaque puits. Les microplaques sont lues au spectrophotomètre à 562 nm contre une référence à 690 nm. La concentration en nitrite est proportionnelle à celle de l'oxyde nitrique. La concentration en nitrite est déterminée par rapport à une courbe standard, linéaire de 1 à 25 µM de nitrite.

Les résultats sont exprimés après soustraction du témoin négatif, en moyenne  $\pm$  écart type sous forme d'une courbe dose/réponse.

15

Dans cette expérience les composés selon l'invention induisent une production d'oxyde nitrique par les macrophages murins avec une courbe effet-dose. Le produit diphosphorylé induit une prolifération plus importante que celle induite par le LPS de *E. coli*, mais la concentration minimale nécessaire pour induire une réponse significative est supérieure. Le produit monophosphorylé induit une réponse plus faible que celle du produit diphosphorylé et que celle du LPS de *E. coli*. La figure 2 représente une expérience représentative tirée d'un ensemble de 3 expériences indépendantes obtenues à partir de préparations cellulaires différentes.

25 **4. Détermination de la capacité des composés selon l'invention à activer la production de TNF- $\alpha$ -de macrophages alvéolaires humains.**

***Protocole***

30 **Obtention des macrophages alvéolaires** : Les macrophages alvéolaires humains ont été obtenus par lavage bronchoalvéolaire (BAL) de poumons de patients atteints de cancer du poumon. Le BAL est effectué immédiatement après chirurgie sur du tissu pulmonaire provenant des parties saines du lobe pulmonaire. Les lavages sont effectués avec NaCl 0.9 % à l'aide d'une seringue de 50ml. Les cellules obtenues

sont constituées à >85 % de macrophages, les autres cellules étant principalement des lymphocytes. Après centrifugation, les cellules sont remis s en suspension avec du milieu RPMI et les globules rouges sont éliminés par centrifugation sur Ficoll Paque (Research Grade). Les macrophages sont lavés 3 fois avec HBSS et  
5 implantés dans des microplaques à 24 puits, à raison de 1 ml par puits contenant un total de 1'000'000 de cellules. Après une heure d'incubation à 37° C, les macrophages sont adhérents et les puits sont lavés à 3 reprises avec 1 ml de HBSS afin d'éliminer les cellules non-adhérentes. Après les lavages, 1 ml de RPMI est ajouté dans chacun des puits contenant les macrophages.

10

Incubation avec les produits et dosage du TNF- $\alpha$  : les macrophages alvéolaires sont incubés à 37° C et 5 % de CO<sub>2</sub> avec des concentrations de 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml et 10  $\mu$ g/ml des produits suivants :

15

- témoin négatif : RPMI
- témoin positif : LPS de *E.coli* (serotype O5:B5, Difco, Detroit, U.S.A.)
- composé monophosphorylé selon l'invention (OM-294-MP)
- composé diphosphorylé selon l'invention (OM-294-DP)

20

Les surnageants des cultures sont récoltés après 24 heures et analysés pour leur teneur en TNF- $\alpha$  (Kit BioSource Cytoscreen, Camarillo, CA, U.S.A.) avec une limite de détection à 1 pg/ml.

### **Résultats**

25

Les dérivés monophosphorylé et diphosphorylé selon l'invention induisent une production modérée de TNF- $\alpha$  à partir de 10  $\mu$ g/ml. Le dérivé monophosphorylé selon l'invention induit une production de TNF- $\alpha$  supérieure à celle du dérivé diphosphorylé. Le contrôle positif LPS induit aux 3 concentrations testées une production élevée de TNF- $\alpha$ .

30

Les résultats sont présentés dans le Tab (a).

Tableau (a) Induction par l'OM-294-MP et l'OM-294-DP de la production de TNF- $\alpha$  par des macrophages alvéolaires humains.

Produit	TNF- $\alpha$ [pg/ml]			
	moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences indépendantes			
	0 $\mu$ g/ml	0,1 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
Témoin négatif : RPMI	195 $\pm$ 70			
Témoin positif : LPS de <i>E. coli</i>		7667 $\pm$ 1155	9858 $\pm$ 2148	10390 $\pm$ 3415
OM-294-MP-1		246 $\pm$ 38	353 $\pm$ 75	1049 $\pm$ 295
OM-294-MP-2		205 $\pm$ 62	291 $\pm$ 70	1124 $\pm$ 406
OM-294-DP-1		156 $\pm$ 66	117 $\pm$ 85	329 $\pm$ 141
OM-294-DP-2		171 $\pm$ 79	88 $\pm$ 61	

5 **5. Détermination de la capacité des composés selon l'invention à inhiber la production de TNF- $\alpha$  de macrophages alvéolaires humains, induite par le lipopolysaccharide de *E. coli* (LPS)**

***Protocole***

Obtention des macrophages alvéolaires : Les macrophages alvéolaires humains ont été obtenus par lavage bronchoalvéolaire (BAL) de poumons de patients atteints de cancer du poumon. Le BAL est effectué immédiatement après chirurgie sur du tissu pulmonaire provenant des parties saines du lobe pulmonaire. Les lavages sont effectués avec NaCl 0,9 % à l'aide d'une seringue de 50 ml. Les cellules obtenues sont constituées à >85 % de macrophages, les autres cellules étant principalement des lymphocytes. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension avec du milieu RPMI et les globules rouges sont éliminés par centrifugation sur Ficoll Paque (Research Grade). Les macrophages sont lavés 3 fois avec HBSS et implantés dans des microplaques à 24 puits, à raison de 1 ml par puits contenant un total de 1'000'000 de cellules. Après une heure d'incubation à 37° C, les macrophages sont adhérents et les puits sont lavés à 3 reprises avec 1 ml de HBSS



afin d'éliminer les cellules non-adhérentes. Après les lavages, 1 ml de RPMI est ajouté dans chacun des puits contenant les macrophages.

Incubation avec les produits et dosage du TNF- $\alpha$  : les macrophages alvéolaires sont incubés à 37° C et 5 % de CO<sub>2</sub> avec du LPS d'*E. coli* (serotype O5: B5, Difco, Detroit, U.S.A.) à 1 µg/ml additionné simultanément des produits suivants aux concentrations de 10 µg/ml :

- témoin négatif : RPMI
- composé monophosphorylé selon l'invention (OM-294-MP)
- 10 - composé diphosphorylé selon l'invention (OM-294-DP)

Les surnageants des cultures sont récoltés après 24 heures et analysés pour leur teneur en TNF- $\alpha$  (Kit BioSource Cytoscreen, Camarillo, CA, U.S.A.) avec une limite de détection à 1 pg/ml.

15

### **Résultats**

Le dérivé diphosphorylé inhibe de manière importante la production de TNF- $\alpha$  normalement induite par le LPS. Le dérivé monophosphorylé inhibe partiellement la production de TNF- $\alpha$  induite par le LPS.

- 20 Les résultats sont présentés dans les Tab (a).

**Tableau (a) Inhibition par l'OM-294-MP et OM-294-DP de la production de TNF- $\alpha$  induite sur des macrophages alvéolaires humains par le LPS.**

Produit	TNF- $\alpha$ [pg/ml]	% d'inhibition
RPMI (témoin négatif)	73	—
LPS de <i>E. coli</i> seul (1 $\mu$ g/ml) (témoin positif)	8170	0
OM-294-MP-1 (10 $\mu$ g/ml) + LPS de <i>E. coli</i> (1 $\mu$ g/ml)	4577	44
OM-294-MP-2 (10 $\mu$ g/ml) + LPS de <i>E. coli</i> (1 $\mu$ g/ml)	4789	41
OM-294-DP-1 (10 $\mu$ g/ml) + LPS de <i>E. coli</i> (1 $\mu$ g/ml)	1267	84
OM-294-DP-2 (10 $\mu$ g/ml) + LPS de <i>E. coli</i> (1 $\mu$ g/ml)	1280	84

## **6. Effet des produits OM-294-MP et OM-294-DP sur la maturation des cellules**

### **5 dendritiques humaines.**

La capacité des produits OM-294-MP et OM-294-DP à induire la maturation des cellules pré-dendritiques en cellules dendritiques a été évaluée. Les paramètres suivants sont mesurés: incorporation du Dextran-FITC et expression des molécules de surface CD40, CD80, CD83, CD86.

### **10 Protocole**

Cellules : les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées des "buffy coats" de 6 donneurs sains. Les donneurs n'ont subi aucun traitement avant le don du sang.

Préparation des cellules : les monocytes purifiés par adhérence sont remis en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, U.S.A.) contenant 10% de sérum de veau fœtal, du GM-CSF (10 ng/ml; IM-HGM1, Immungenex Corp, Los Angeles, CA, U.S.A.) et de l'IL-4 (10 ng/ml; No 204-IL, R&D System, Minneapolis, MN, USA) à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/ml et distribués dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (P10, Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK) ( $10 \times 10^6$  cellules par boîte P10) pendant 6 jours (avec un changement de milieu après 3 jours). Ces cellules sont appelées cellules prédendritiques (DC-6). La maturation d s cellules prédendritiques en cellules dendritiques matures est réalis´e par incubation avec OM-294-MP, OM-294-DP ou LPS pendant 3 jours

supplémentaires aux concentrations indiquées ci-après sous Produits. Au jour 9 (DC-9), les cellules sont récoltées pour analyser les différents paramètres indicateurs de la maturation des cellules dendritiques: les molécules de surface CD40, CD80, CD83, CD86 ainsi que la capacité d'incorporer du Dextran-FITC sont évalués. Tous ces paramètres sont analysés par FACS EPICS-XL-MCL (Coulter Immunology, Hialeah, Finlande).

Lanzavecchia *et al.*, J. Exp. Med 179 (1994) 1109; Lanzavecchia *et al.*, J. Exp. Med 182 (1995) 389.

Evaluation des résultats : l'expression des molécules de surface est exprimée en % de la fluorescence moyenne des cellules stimulées par LPS (témoin positif) ; l'incorporation du Dextran est calculée par rapport à celle des cellules maintenues dans le milieu et est exprimée en %. L'analyse statistique par le test t-student compare les valeurs obtenues dans les différents tests aux valeurs du témoin positif. Les valeurs de  $p < 0.05$  sont considérées comme significatives.

Produits : les solutions mères de OM-294-DP et OM-294-MP sont préparées à 1 mg/ml dans 0.9% NaCl/eau, additionnée de 0.1% triéthylamine pour l'OM-294-MP. Les solutions sont incubées à 37°C pendant 20 min, agitées vigoureusement pendant 3 min puis dilués à 100 µg/ml dans du milieu de culture RPMI 1640 et utilisés soit à 10 µg/ml (Fig. 3, 6, 7, 8) soit à des concentrations comprises entre 0.02 et 25 µg/ml (Fig. 4, 5)

Produit de référence : lipopolysaccharide de E. coli (LPS, DIFCO, Detroit, MI, U.S.A.), solution stock 5 mg/ml dans PBS. Une solution intermédiaire est préparée à 100 µg/ml dans du milieu de culture RPMI 1640. Les concentrations testées sont soit de 10 µg/ml (Fig. 3, 6, 7, 8) soit des valeurs de 0.02 à 10 µg/ml (Fig. 4, 5)

## Résultats

Les cellules dendritiques immatures (DC-6) issues de la différenciation des monocytes, par l'effet conjugué de GM-CSF et d'IL-4, sont capables d'incorporer le Dextran-FITC. Au cours du processus de maturation, les cellules perdent la capacité d'incorporer le Dextran-FITC. Les analyses sont effectuées au stade de différenciation DC-9.

Les résultats sont exprimés en % de l'incorporation du Dextran-FITC observée dans les cellules non stimulées (milieu) Fig. (3). Les cellules traitées avec du LPS ou OM-294-MP ne conservent respectivement que 10% et 19% de phagocytose, tandis

que les cellules stimulées par OM-294-DP gardent la totalité de leur capacité d'incorporer le Dextran (98 et 99%). Une courbe dos réponse indique qu l'OM-294-MP montre des capacités exceptionnelles à induire une différenciation des cellules DC-6 en DC-9 à des concentrations allant de 0.02 µg à plus de 25 µg par ml, voir Fig. (4) basses concentrations et Fig. (5) concentrations plus élevées.

L'expression des molécules de surface costimulatrices est un autre critère de maturation des DC. L'expression des CD40, CD80, CD83, CD86 est testée. Les résultats sont exprimés en % de la moyenne de fluorescence par rapport à l'expression de ces marqueurs induite par le LPS.

OM-294-MP augmente l'expression de toutes les molécules de surfaces analysées : CD40 (39%), CD80 (62%), CD83 (60%), CD86 (77%) voir Fig. (6, 7, 8, 9).

OM-294-DP montre un effet similaire à celui du milieu de culture sur l'expression des marqueurs étudiés. Cet effet ne dépasse pas 20% de l'effet du LPS.

#### **7. Effet des produits OM-294-MP et OM-294-DP sur la production de $TNF\alpha$ et d'IL-12 p70 par des monocytes et des cellules prédendritiques au stade DC-6.**

Des cellules DC-6 ( $5 \times 10^5$ /500 µl de milieu) sont stimulées pendant 4h, 6h et 24h, soit par le LPS (10 µg/ml) soit par l'OM-294-MP (10 µg/ml) ou l'OM-294-DP (10 µg/ml).

#### ***Protocole***

Conditions expérimentales in vitro : Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées des "buffy coats" de 6 donneurs sains (les donneurs n'ont subi aucun traitement avant le don du sang). Les monocytes sont isolés sur un gradient de Ficoll puis purifiés par adhérence. Les monocytes adhérents d'une manière lâche sont ensuite récoltés et une partie des cellules gardées comme monocytes. Les monocytes purifiés sont remis en suspension dans du milieu RPMI-1640 contenant 10% de FCS, à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/ml et distribués dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (P10 - Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK) à raison de  $10 \times 10^6$  cellules/boîte P10. Les cellules sont mises en culture dans le milieu RPMI 1640 complet contenant du GM-CSF (10 ng/ml) et de l'IL-4 (10 ng/ml) pendant 6 jours. Au jour 6, les cellules sont récoltées, lavées 3 fois avec HBSS et réparties dans une

plaque de 24-puits à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par puits dans 500  $\mu$ l de milieu RPMI complet et stimulées avec LPS (10  $\mu$ g/ml), OM-294-MP (10  $\mu$ g/ml) ou OM-294-DP (10  $\mu$ g/ml). Le  $\text{TNF}\alpha$  ainsi que l'IL-12 p70 sont dosés par ELISA dans les surnageants des cultures qui sont recueillis après 4, 6 et 24 heures.

- 5 Produits : les produits OM-294-MP et OM-294-DP (solution stock à 1 mg/ml dans de l'eau stérile) sont incubés à 37°C pendant 20 min et agités vigoureusement pendant 3 min puis dilués à 100  $\mu$ g/ml et utilisés à la concentration finale de 10  $\mu$ g/ml dans du milieu de culture RPMI 1640.

- 10 Produit de référence : lipopolysaccharide de *E. coli* (LPS, DIFCO, Detroit, MI, U.S.A.), solution stock 5 mg/ml dans PBS, solution intermédiaire dans le milieu de culture : 100  $\mu$ g/ml, utilisé à la concentration finale de 10  $\mu$ g/ml.

- 15 Dosage du  $\text{TNF}\alpha$  et de l'IL-12 p70 : Kit  $\text{TNF}\alpha$  Biosource KHC3012, lot PP003-J061703 (Biosource International, Camarillo, CA, U.S.A.). Protocole ELISA selon notice du kit du fournisseur. L'IL-12 p70 est dosé dans les surnageants des cultures par ELISA en utilisant le kit pour IL-12 humaine (No D1200, lot 990 6232, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

## Résultats

### $\text{TNF}\alpha$

- 20 L'OM-294-MP stimule la production de  $\text{TNF}\alpha$  par les cellules DC-6 de façon similaire à celle du LPS tant du point de vue de la cinétique de production que de la concentration de  $\text{TNF}\alpha$  (Fig (10)). Le pic de  $\text{TNF}\alpha$  est situé pour les deux produits entre 6 h et 24h.

- 25 L'OM-294-DP ne stimule que marginalement la production de  $\text{TNF}\alpha$  par les cellules DC-6.

### IL-12 p70

D'une manière générale, l'IL-12 est induite en présence d'IFN- $\gamma$  (LPS+IFN- $\gamma$ , OM-294-MP + IFN- $\gamma$ ) dans les monocytes (Fig (12)) et les DC-6 (Fig (11)). La cytokine apparaît plutôt dans les DC que dans les monocytes.

**8. Evaluation des propriétés adjuvantes de OM-294-DP et OM-294-MP dans un modèle d'immunisation des souris avec un peptide synthétique (Pb CS His<sub>6</sub>-242-310) de la région C-terminale de la protéine de surface du circumsporozoite de *Plasmodium berghei*.**

***Protocole***

**Antigène:** le peptide Pb CS (HHHHHHGGMN NKNNNNDDSY IPSAEKILEF VKQIRDSITE EWSQCNVTCG SGIRVRKRKG SNKKAEDLTL EDIDTEI), dénommé ci-après His<sub>6</sub>-242-310, correspondant à la séquence des acides aminés 242 à 310 de la protéine du circumsporozoite de *Plasmodium berghei* souche ANKA additionnée sur la partie N-terminale de 6 résidus histidine, de 2 glycines et d'une méthionine est obtenu par synthèse selon la méthode de Merrifield et Atherton (Atherton et al., Bioorg. Chem. **8** (1979) 350-351.). Le polypeptide est préparé sur résine p-alkoxybenzylalcool (résine de Wang) avec un degré de substitution de 0.4 mmol/g. Un excès molaire de 10x des dérivés F-moc des acides aminés est utilisé avec une durée de couplage de 30 min. Le peptide est purifié par chromatographie d'exclusion de taille (Sephadex G25, Pharmacia, S), puis par chromatographie sur phase inverse (W-Porex 5 C-4, 250 x 10 mm, Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.) avec un gradient, en 40 min, allant d'un mélange de 10 à 50% acétonitrile dans 0.1% acide trifluoroacétique/eau (v/v), débit 3 ml/min. La composition en acides aminés du peptide purifié est déterminée selon Knecht et Chang (Anal. Chem. **58** (1986) 2373-2379,) et le poids moléculaire est confirmé par spectrométrie de masse sur Voyager-DE (Perseptive Biosystem, Framingham, MA, U.S.A.). La solution mère de l'antigène est préparée à 0.4 mg/ml dans 0.9% NaCl/eau à pH 8.0.

**Adjuvants:** les solutions mères de OM-294-DP et OM-294-MP sont préparées à 1 mg/ml dans 0.9% NaCl/eau, additionnée de 0.1% triéthylamine pour l'OM-294-MP. Le témoin positif est constitué par l'adjuvant incomplet de Freund (IFA de Difco, Detroit, MI, U.S.A.) et le témoin négatif est une solution de 0.9% NaCl.

**Mélange antigène-adjuvant:** un volume d'antigène et un volume d'adjuvant sont mélangés 3 min par Vortex.

**Immunisation:** des souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines (6 souris par groupe) sont immunisées à trois reprises, par injection sous-cutanée à la base de la queue de 0.1 ml des mélanges suivants:

groupe	adjuvant 0.05 mg/injection	antigène 0.02 mg/injection	nombre de souris
1	---	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
2	IFA	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
3	OM-294-MP	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
4	OM-294-DP	Pb CS His <sub>6</sub> -242-310	6
5	OM-294-MP	---	6
6	OM-294-DP	---	6

Schéma d'immunisation et des prélèvements :

Semaines	<u>0</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>7</u>	<u>9</u>
Immunisations	↑	↑		↑	
Réponse anticorps spécifiques	↑	↑		↑	↑
Réponse CTL			↑		↑

Prélèvements du sang et des organes lymphoïdes :

Obtention du sérum: des prélèvements de sang sont effectués aux temps 0, 3, 7 et 9 semaines. Le sang est laissé reposer 60 min à 37°C, puis placé pendant une nuit à 4°C. Le sérum est ensuite congelé à -80°C jusqu'au dosage des anticorps.

Prélèvement des ganglions inguinaux et de la rate : quelques animaux de chaque groupe sont sacrifiés après 4 ou respectivement 9 semaines. Les ganglions inguinaux et la rate sont prélevés chirurgicalement.

10 Détermination du titre d'anticorps anti-Pb CS His<sub>6</sub> 242-310:

Le dosage du titre d'anticorps dirigé spécifiquement contre l'antigène Pb CS His<sub>6</sub> 242-310 est réalisé par ELISA. La fixation de l'antigène est effectuée en microplaque à 96 puits (Maxisorp F 96, Nunc, DK) par incubation pendant une nuit en chambre humide à 4°C avec dans chaque puits 0.1 ml de PBS (*phosphate buffered saline*) contenant 0.001 mg/ml d'antigène Pb CS His<sub>6</sub>-242-310. La saturation de la microplaque est effectuée avec du PBS contenant 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Fluka, CH). Les plaques sont lavées avec du PBS contenant 0.05% de Tween 20 (Sigma, Saint-Louis, MO, U.S.A.). Les sérums prélevés aux temps 0, 3, 7 et 9 semaines sont dilués en série avec le tampon de dilution (PBS contenant 2.5% de lait en poudre dégraissé et 0.05% de Tween 20), puis transférés dans la microplaque et laissés 1 h à température ambiante (TA). Les plaques sont ensuite lavées avec du

PBS, la solution de dilution contenant l'anticorps polyclonal anti-immunoglobuline de souris conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma, Saint-Louis, MO, U.S.A.) est ajoutée aux plaques et incubée 1 h à TA. Les plaques sont lavées avec du PBS et les anticorps spécifiques mis en évidence par réaction colorimétrique avec le substrat de la phosphatase alcaline, le p-nitrophenylphosphate (Sigma, Saint-Louis, MO, U.S.A.). L'absorbance à 405 nm est mesurée avec un lecteur de microplaque (Dynatech 25000 ELISA reader, Ashford, Middlesex, UK), chaque sérum est déterminé en duplicat. Les résultats présentés sont la moyenne des valeurs obtenues pour les souris de chaque groupe. Le titre d'anticorps est déterminé par la dernière dilution induisant une réponse positive significative, c'est-à-dire avec une valeur de densité optique supérieure à la valeur du bruit de fond additionnée de 3 écart-types.

#### Dosages ELISPOT :

Les anticorps spécifiques anti-interféron- $\gamma$  de souris (O1E703B2) sont fixés par incubation pendant une nuit à 4 °C en chambre humide, d'une solution d'anticorps à 50  $\mu$ g/ml dans une microplaque ELISPOT dont le fond des puits est couvert de nitrocellulose (Millipore, Molsheim, F). L'étape de saturation est effectuée par ajout de DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS, Fakola, CH) pendant 2 heures à 37°C. Les cellules obtenues à partir des organes lymphoïdes (ganglions inguinaux et rate) sont mises en culture dans les microplaques à 200'000 cellules par puits, puis co-cultivées pendant 24h à 37°C avec 100'000 cellules P815 pulsées ou non avec le peptide court Pb CS 245-252. Après l'incubation, les cellules sont éliminées et après lavage, un second anticorps anti-IFN- $\gamma$  de souris biotinylé (ANI, 2  $\mu$ g/ml dans PBS avec 1% BSA) est ajouté pendant 2 h. La streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim, Mannheim, RFA) est ajoutée et incubée 1 h à 37°C, 3 lavages sont effectués avec du PBS contenant 0.05% de Tween 20, suivi par 3 lavages avec du PBS. La présence des complexes immuns anti-IFN- $\gamma$  est mise en évidence par l'ajout du substrat BCIP/NBT (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.). La réaction est arrêtée par lavage à l'eau courante. Les spots positifs à l'IFN- $\gamma$  sont alors comptés au microscope binoculaire. Les spots spécifiques correspondent à la différence entre le nombre de spots comptés en présence des cellules pulsées avec le peptide et le nombre de spots comptés en l'absence de peptide. Les résultats



représentent sont la moyenne des valeurs obtenues pour les souris de chaque groupe. Ils sont exprimés en nombre de spots par million de cellules mises en culture.

## 5 **Résultats**

Réponse anticorps : la production spécifique des anticorps anti-Pb CS His<sub>6</sub>-242-310, déterminée par ELISA est présentée graphiquement pour les souris ayant reçu une, deux et trois immunisations. Le contrôle effectué avec une seule injection de l'antigène seul donne un titre d'anticorps très faible. Le titre d'anticorps atteint avec une seule injection de l'antigène mélangé avec l'OM-294-MP ou respectivement l'OM-294-DP est déjà pratiquement aussi élevé qu'avec l'adjuvant de Freund incomplet (IFA) mélangé au même antigène (Fig. (13)). Après deux injections, les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP sont capables d'éluciter une réponse sérologique respectivement supérieure ou égale à celle de l'IFA (Fig (14)). Après trois injections les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP sont capables d'éluciter une réponse sérologique supérieure à celle de l'IFA (Fig. (15)).

Fig. (13) ELISA, effectué 3 semaines après la première immunisation.

Fig. (14) ELISA, effectué 4 semaines après la deuxième immunisation.

Fig. (15) ELISA, effectué 2 semaines après la troisième immunisation.

Fig. (16) Titre d'anticorps avant et après une, deux et trois immunisations.

Les titres d'anticorps des animaux de chaque groupe avant l'immunisation et après une, deux et trois immunisations sont présentés en tant que moyenne (Fig. (16)).

Réponse CTL : la reconnaissance de l'épitope T Pb CS 245-252 présent dans le peptide Pb CS His<sub>6</sub> -242-310 ayant servi à l'immunisation est bien mise en évidence par le test de l'ELISPOT. La réponse des lymphocytes T provenant des animaux immunisés (ganglions inguinaux et rate, prélevés une semaine après la deuxième injection et respectivement deux semaines après la troisième injection) est mise en évidence par une augmentation du nombre de spots positifs pour l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Les résultats présentés dans les Fig (17, 18, 19, 20) sont les moyennes des valeurs obtenues à chaque dilution et pour les souris de chaque groupe. Ils sont exprimés en nombre de spots par million de cellules mises en culture.

Les deux adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP augmentent de façon très significative la réponse CTL des lymphocytes provenant de la rate et des ganglions inguinaux. Les réponses de la rate sont supérieures à celles des ganglions

inguinaux. Les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP induisent une activité CTL nettement supérieure à celle de l'IFA.

### **9. Mise en évidence de l'association non-covalente OM-294 – antigène par électrophorèse capillaire.**

L'électrophorèse capillaire est utilisée dans cet exemple pour mettre en évidence une association non-covalente entre l'OM-294-DP et le peptide Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 lors de la formulation de la préparation vaccinale.

#### ***Protocole***

Méthode d'analyse :

tampon 20 mM borate de sodium (tétraborate de di-sodium décahydraté, Merck N° 6306) pH ajusté à 7.4 avec NaOH 1N (Fluka N° 72072)

Capillaire de zone (non greffé), longueur 30 cm, diamètre 50 µm.

Détection à 200 nm sur appareil Beckman PACE MDQ (Beckman, Brea, CA, U.S.A.).

#### **Conditions de séparation**

Temps [min.]	Action	Pression	Solvant
0.00	Lavage capillaire	20.0 psi	H <sub>2</sub> O
3.00	Lavage capillaire	20.0 psi	NaOH 1N
6.00	Injection de l'échantillon	0.5 psi	Tampon borate
6.08	Séparation	30.0 KV	Tampon borate

**Antigènes** : Peptide synthétique Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 à 1 mg/ml dans H<sub>2</sub>O

**Adjuvant** : OM-294-DP à 1 mg/ml dans H<sub>2</sub>O

**Mélange antigène – adjuvant** : 250 µg/ml + 250 µg/ml

#### ***Résultats***

L'association antigène – adjuvant de cette formulation d'une préparation vaccinale est mise en évidence sur l'électrophérogramme par la disparition du pic de l'adjuvant et le déplacement du pic de l'antigène au profit d'un nouveau pic spécifique de l'association (Fig (21)).

**10. Traitement d'une carcinomatose péritonéale induite par l'injection de cellules de la lignée tumorale syngénique PROb chez le rat BDIX.**

L'objectif de cette expérience est de mettre en évidence un effet antitumoral de l'OM-294-DP administré par voie parentérale i.v. répétée aux rats porteurs de tumeurs macroscopique de quelques mm.

**Protocole**

Les animaux : la souche de rats BDIX consanguins a été établie en 1937 par H. Druckrey. Un couple de rats provenant du Max Planck Institut de Fribourg (RFA) est à l'origine de la colonie maintenue depuis 1971 dans l'animalerie du laboratoire par le système de la lignée unique. Selon ce système, à chaque génération, un seul couple frère-soeur est choisi pour donner les descendants de la génération suivante. Les rats utilisés pour ce travail viennent du Centre d'Élevage des Animaux de Laboratoire d'Iffa-Credo (l'Arbresle, F) à qui le laboratoire a confié l'élevage de la souche. Les rats utilisés sont des mâles âgés de 3 mois  $\pm$  1 semaine.

**15 Induction des tumeurs par injection des cellules PROb :**

Origine des cellules PROb : une greffe d'un fragment d'un carcinome colique induit chez un rat BDIX consanguin par la 1,2-diméthylhydrazine est à l'origine de la lignée cellulaire DHD/K12. Cette lignée de cellules adhérentes a été subdivisée en deux sous-lignées en fonction de la sensibilité des cellules à la trypsine, et ont été appelées DHD/K12-TR les cellules se détachant difficilement. Les cellules DHD/K12-TR injectées à des rats BDIX syngéniques induisent des tumeurs progressives. Cette lignée est clonée, seul le clone DHD/K12-TRb désigné ultérieurement PROb est utilisé pour ce travail.

Conditions de culture : les cellules PROb, adhérentes, sont cultivées en flacons de culture fermés (Falcon, Becton Dickinson, New-Jersey, USA), à 37°C dans du milieu complet composé de milieu F10 de Ham (Bio-Whittaker, Walkersville, USA) auquel sont ajoutés 10% de sérum de veau foetal (FCS, Anval, Betton, F). Ce milieu de culture est changé tous les 3 jours. A confluence, les cellules sont détachées de leur support par 2 ml d'une solution EDTA/trypsine en 3 à 5 min, ceci après 3 rinçages de 2 ml de la même solution pendant 2 à 3 min; les cellules sont reprises par du milieu complet, le FCS bloquant l'action de la trypsine. L'absence de contamination des cellules par des mycoplasmes et bactéries est vérifiée régulièrement par coloration de l'ADN avec le fluorochrome Hoechst 33258 (Aldrich Chimie, Steinheim, RFA).

Induction de la carcinomatose péritonéale : les cellules PROb sont détachées de leur support comme indiqué au paragraphe "conditions de culture" et sont comptées dans une solution de bleu trypan, colorant qui permet d'apprécier la viabilité cellulaire. Les cellules sont mises en suspension dans du milieu F10 de Ham. Les

5 carcinomatoses péritonéales sont induites par injection intrapéritonéale (i.p.) de  $10^6$  cellules PROb viables à un rat BDIX syngénique anesthésié à l'éther. Le jour J0 correspond au jour d'injection des cellules tumorales. Dans ces conditions, tous les rats développent une carcinomatose péritonéale avec production d'ascite hémorragique et meurent entre la 6ème et la 12ème semaine après l'injection des

10 cellules.

Traitement des carcinomatoses péritonéales : le traitement commence 13 jours après l'injection des cellules tumorales lorsque les carcinomatoses sont constituées de nodules de quelques mm de diamètre. Il consiste en 10 injections i.v. d'OM-294-DP à la dose de 1 mg/kg et à la concentration de 0.6 mg/ml dissous dans

15 du NaCl 0.9%. Les injections sont faites 3 fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi) dans la veine du pénis. Le groupe témoin est traité avec le véhicule seul NaCl 0.9%.

Evaluation de l'efficacité du traitement : à J42, 6 semaines après l'injection des cellules tumorales, les rats sont sacrifiés et autopsiés, les carcinomatoses sont

20 évaluées en aveugle. Il n'est pas possible de mesurer le volume d'une carcinomatose, par contre il est possible de classer les carcinomatoses en différentes catégories. Cinq classes sont définies en fonction du nombre et du diamètre des nodules:

Classe 0 : aucun nodule n'est visible

25 Classe 1 : des nodules de 0,1 à 0,2 cm de diamètre peuvent être dénombrés

Classe 2 : de nombreux nodules de 0,1 à 0,5 cm qui ne peuvent plus être comptés

Classe 3 : les nodules, dont certains atteignent un cm de diamètre, envahissent la cavité péritonéale

Classe 4 : la cavité est entièrement envahie par des masses tumorales de plusieurs

30 cm.

Evolution du volume de l'ascite et du poids des animaux : le volume d'ascite est mesuré par double pesée des rats. Un groupe de rats témoins, n'ayant eu aucun traitement mais des injections de NaCl 0.9%, permet d'apprécier l'évolution normale de la carcinomatose et d'évaluer l'effet du traitement.

Détermination de l'efficacité du traitement : la durée de vie des rats des groupes traités est comparée à celle du groupe témoin; le volume des carcinomatoses et des ascites des rats des groupes traités sont comparés à ceux des rats du groupe témoin.

- 5 Etude statistique : La signification statistique de l'effet de l'immunothérapie est déterminée par un test de Kruskal-Wallis pour la classification des carcinomatoses, un test d'analyse de variance pour le volume d'ascite, un test de log rank pour les survies.

### **Résultats**

- 10 Carcinomatoses : l'OM-294-DP montre une activité antitumorale remarquable dans ce modèle. Cette activité est plus particulièrement mise en évidence par le nombre d'animaux sans tumeurs (classe 0) et la différence avec le témoin NaCl est significative ( $p < 0,05$ ) pour le volume tumoral. L'impact du traitement avec OM-294-DP sur le volume d'ascite est aussi significatif ( $p < 0,05$ ).

- 15 Tab (a) Classe des carcinomatoses et volume d'ascite

Traitement	Nombre de rats présentant des carcinomatoses de classe					Effet du produit (*)	Volume d'ascite ml/rat		Effet du produit (**)
	0	1	2	3	4		limites	moyenne $\pm \sigma$	
NaCl <sup>(1)</sup>	1	0	1	0	7	---	0-84	38 $\pm$ 29	---
OM-294-DP <sup>(2)</sup>	4	1	2	1	2	$p < 0.05$	0-73	8 $\pm$ 23	$p < 0.05$

(\*) : test de Kruskal Wallis; (\*\*) : analyse de variance.

- (1) : 8 des 10 rats sont morts de leur cancer avant le sacrifice, 1 à J34 présentait des nodules et un ictère mais la classe n'a pu être déterminée (cannibalisme), 1 à J37 (classe 4), 2 à J38 (classe 4), 1 à J39 (classe 4), 2 à J40 (classe 4) et 1 à J41 (classe 4). Le rat de classe 0 présentait à l'autopsie une tumeur sous cutanée, il est probable que l'injection des cellules cancéreuses ait été manquée.

- (2) : 1 rat est mort à J14 lors de la 1<sup>ère</sup> injection du traitement, il ne présentait pas de carcinomatose. L'un des rats sacrifiés de classe 0 comportait une tumeur sous cutanée (injection des cellules cancéreuse manquée).

Survie :

Les animaux sont sacrifiés à J42. La survie déterminée au 42<sup>ème</sup> jour après l'injection des cellules tumorales, 90% des animaux traités avec OM-294-DP ont survécu, alors que dans le groupe non traité seul 20 % des animaux sont encore en vie.

- 5 L'OM-294-DP prolonge de façon significative la survie des rats ( $p < 0.001$ ).

Poids :

L'OM-294-DP n'a pas d'effet significatif sur l'évolution du poids par rapport aux animaux ayant reçu le NaCl seul comme l'indique les valeurs du Tab (b).

Tab (b) évolution des poids des rats (moyennes  $\pm$  écart-type)

Jours	NaCl	OM-294 DP
0	314 $\pm$ 19	277 $\pm$ 19
13	337 $\pm$ 18	310 $\pm$ 21
20	342 $\pm$ 20	304 $\pm$ 23
29	361 $\pm$ 23	317 $\pm$ 24
41	314 $\pm$ 38	327 $\pm$ 26

10

**11. Evaluation des propriétés de l'adjuvant OM-294-DP dans un modèle d'immunisation chez la souris par voie nasale avec la sous-unité B de l'uréase de *Helicobacter pylori***

- 15 Il est démontré que des souris peuvent être protégées d'une infection par *Helicobacter pylori* en les immunisant par voie orale ou nasale avec la sous-unité B de l'uréase d'*Helicobacter pylori* (UreB) en présence de l'adjuvant *cholera toxin* (CT) Corthésy-Teulaz I. et al, Gastroenterology 109 (1995) 115. ; Michetti P. et al, Gastroenterology 116 (1999) 804 ; Saldinger P.F. et al, Gastroenterology 115 (1998)
- 20 891. Cette réponse humorale anti-UreB mesurée dans le sérum des souris immunisées est principalement de type IgG1 (réponse Th2). L'effet adjuvant de l'OM-294-DP est évalué chez des souris BALB/c (n=6) immunisées 4 fois à une semaine d'intervalle par voie nasale avec la sous-unité B de l'uréase de *Helicobacter pylori* recombinante (UreB) en présence de l'adjuvant OM-294-DP. Des souris
- 25 BALB/c témoins sont immunisées avec l'adjuvant OM-294-DP seul. Deux semaines

après la dernière immunisation, du sang de chaque souris est prélevé et le dosage par ELISA d'immunoglobulines anti-UreB dans le sérum (IgG totaux, IgG1 et IgG2a) est effectué.

### **Protocole**

5 **Animaux** : Souris BALB/c/Ola/HsD (Harland, Horst, Hollande) : 24 souris

**Antigène** : HpUreB 1-569, exprimée comme protéine recombinante dans *E. coli* (souche M15, Qiagen, Hilden, D) selon le protocole précédemment décrit (Michetti et al, Gastroenterology 107 (1994) 1002).

**Adjuvant** : OM-294-DP (solution stock à 2.2 mg/ml)

10

### **Protocole d'immunisation :**

Quatre groupes de 6 souris ont été constitués :

**Groupe A** : 6 souris BALB/c sont immunisées 4 fois par voie nasale avec 25 µg OM-294-DP seul (25 µl par dose) une fois par semaine durant 4 semaines consécutives.

15

**Groupe B** : 6 souris BALB/c sont immunisées 4 fois par voie nasale avec 50 µg UreB 1-569 + 25 µg OM-294-DP (25 µl par dose) une fois par semaine durant 4 semaines consécutives.

Deux semaines après la dernière immunisation nasale, du sang de chaque souris des groupes A et B est prélevé par la queue.

20

### **Dosage des IgG dans le sérum :**

**Tampon de coating (pH 9.6)** : pour 1 litre, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15 mM, 1.59 g), NaHCO<sub>3</sub> (34.8 mM, 2.93 g), Thimerosal (0.01%); **Tampon PBS-Tween pH 7.4** : pour 1 litre, NaCl

25

(137 mM, 8.0 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.5 mM, 0.2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8.0 mM, 1.15 g), KCl (2.7 mM, 0.2 g), Tween 20 (0.1%, 1 ml); **Tampon citrate/phosphate pH 5.0** : pour 1 litre, acide

citrique (44.4 mM, 9.32 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (103 mM, 14.6 g); **Solution substrat (O-phenyl diamine = OPD) 10 x conc** : OPD (10 mg/ml dans tampon citrate); **Solution d'azide de sodium** : 1%; **Solution stop** : 0.01% d'azide de sodium dans du tampon

30

citrate/phosphate 0.1 M pH 5.0

Méthode : une solution d'antigène (UreB 1-569 du 26.05.1999, solution stock 0.5 mg/ml) est préparée à la concentration de 5 µg/ml dans le tampon de coating pH 9.6 (pour 50 ml de tampon, 500 µl de la solution d'UreB). On pipète 100 µl par puits dans 3 plaques à 96 puits à fonds ronds (0.5 µg d'UreB par puit). On laisse incubé les plaques 2 heures à 37° C. On élimine le surnageant des plaques. On sature les puits en ajoutant 100 µl d'une solution de PBS-Tween 0.1% + 5% lait en poudre par puit. Incuber les plaques pendant 30 minutes à 37° C. On élimine la solution de saturation et laver 3 fois les puits avec 100 µl de PBS-Tween. On élimine le surnageant. On prépare une dilution de 1 :200 de chaque sérum de souris à tester dans tampon PBS-Tween 0.1 % (5 µl de sérum dans 1 ml de tampon PBS-Tween). Les sera (100 µl) sont répartis en dupliqués dans les 3 plaques (1 plaque pour détecter les IgG totaux, 1 plaque pour détecter les IgG1 et 1 plaque pour détecter les IgG2a). On incube toute la nuit à 4° C. On lave les puits 3 fois avec 100 µl de PBS-Tween. On prépare une dilution 1 :500 des solutions d'anticorps anti-IgG totaux couplé à la biotine (Amersham, Cat # RPN 1177), anticorps anti-IgG1 (Amersham Cat # RPN 1180) et anticorps anti-IgG2a (Pharmingen Cat # 02012D) dans le tampon PBS-Tween. On ajoute 100 µl de la solution d'anticorps anti-IgG totaux dans la plaque n°1, 100 µl de la solution d'anticorps anti-IgG1 dans la plaque n°2 et 100 µl de la solution d'anticorps anti-IgG2a dans la plaque n°3. On incube 1 heure à 37° C. Laver les puits 3 fois avec PBS-Tween. On prépare une dilution 1 :1000 de streptavidine-HRP (Dako, Cat # p0397) dans le tampon PBS-Tween et on ajoute 100 µl par puit. Incuber 30 minutes à 37° C. On lave les puits 3 fois avec 100 µl de tampon PBS-Tween. On prépare la solution de substrat en diluant 1 :10 la solution de OPD (10X) dans le tampon citrate/phosphate 0.1M. On ajoute 1 µl par ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la solution d'OPD diluée. On ajoute 50 µl de la solution de substrat dans chaque puits. On attend 10-20 minutes que la coloration se développe. Stopper la réaction en ajoutant 50 µl de tampon stop. L'absorbance est lue à 492 nm (avec 620 nm de référence de lecture) en utilisant le témoin négatif comme zéro.

Statistiques Les résultats sont présentés comme moyenne  $\pm$  SD (n=6). Les valeurs de p sont calculées par test de Student. Les valeurs de p < 0.05 sont considérées comme significatives.



**Résultats**

Les souris immunisées par voie nasale avec UreB 1-569+OM-294-DP développent une immunité humorale anti-UreB : présence d'anticorps IgG1 anti-UreB 1-569 dans le sang.

- 5 La présence d'anticorps spécifiques contre l'UreB de *Hp* dans le sérum des souris est mesuré par ELISA. L'UreB (0.5 µg/ puit) a été déposée dans des plaques à 96 à fonds ronds dans du tampon carbonate pH 9.6. Les anticorps spécifiques sont détectés à l'aide d'anticorps de lapin anti-IgG totaux, IgG1 et IgG2a. Les résultats sont donnés en densité optique (OD) mesurés à 492 nm. Les valeurs d'OD 3 fois
- 10 supérieures aux valeurs mesurées dans le sérum des souris naïves sont considérées comme positives. Aucun anticorps anti-UreB n'est détecté dans le sérum des souris immunisées par OM-294-DP seul. Les souris immunisées par UreB+OM-294-DP développent également des anticorps IgG totaux anti-UreB (OD =  $0.274 \pm 0.130$ ,  $p < 0.05$ ) et IgG1 anti-UreB (OD =  $0.212 \pm 0.128$ ,  $p < 0.05$ ), mais
- 15 ne développent pas d'anticorps IgG2a anti-UreB (OD =  $0.008 \pm 0.005$ , ns).

- Des souris BALB/c immunisées par voie nasale avec la sous-unité B de l'uréase de *Helicobacter pylori* (UreB) + OM-294-DP développent, une réponse humorale anti-UreB majoritairement de type IgG1. OM-294-DP peut donc agir comme adjuvant
- 20 par voie nasale et aider à développer une immunité humorale de type Th2.

- 12. OM-294-MP et OM-294-DP combinés avec l'antigène H1N1 : détermination d'anticorps spécifiques générés chez la souris après 1 ou 2 administrations par voie sous-cutanée.**
- 25

**Protocole**

- Le but de cette étude est de montrer l'effet adjuvant de OM-294-MP et OM-294-DP pour l'antigène grippal H1N1 (haemagglutinine A/Beijing 262/95, Solvay Duphar, Weesp, NL). Pour cela 60 souris BALB/c (femelles, 8 semaines d'âge au début du
- 30 traitement) sont réparties dans les 6 groupes suivants :

GROUPES	ANTIGENE Final : 2.5 µg par animal/injection	ADJUVANTS Final : 50 µg par animal/injection	NaCl (0.9%)	VOLUME INJECTE
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: H1N1	H1N1 (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: H1N1 + OM-294-MP	H1N1 (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: H1N1 + OM-294-DP	H1N1 (100 µl)	OM-294-DP (50 µl)	-	150 µl
E: OM-294-MP	-	OM-294-MP (50 µl)	100 µl	150 µl
F: OM-294-DP	-	OM-294-DP (50 µl)	100 µl	150 µl

Antigène: la solution mère de H1N1 est préparée à la concentration de 25 µg/ml dans 0.9% NaCl.

5 Adjuvants: les solutions mères de OM-294-DP et OM-294-MP sont préparées à 1 mg/ml dans l'eau pour injection, additionnée de 0.1% triethanolamine pour l'OM-294-MP. Le témoin négatif est constitué d'une solution de 0.9% NaCl sans antigène.

10 Mélange antigène-adjuvant: les adjuvants sont placés 20 minutes à 37°C avant d'être vortexés pendant 3 minutes. Puis l'antigène et le NaCl (0.9%) sont ajoutés comme indiqué dans le tableau ci-dessus, et le mélange antigène/adjuvant est vortexé brièvement avant d'être mis sur un agitateur rotatif pendant 15 minutes à température ambiante, puis le tout est vortexé pendant 3 minutes

15 Immunisations: les injections ont lieu aux jours 0 et 14. Les mélanges indiqués dans le tableau précédent sont administrés par voie sous-cutanée (75 µl par flanc, au total 150 µl par animal). Les prises de sang ont lieu aux jours 14 et 28 (ponction orbitale).

20 Dosage des immunoglobulines anti-H1N1: les immunoglobulines sériques spécifiques pour H1N1 suivantes sont déterminées en duplicats par ELISA : IgG1, IgG2a, et IgM . En bref, des plaques micropuits (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) sont incubées (coating overnight) à 4°C avec 100 µl de H1N1 (0.5 µg) dans un tampon bicarbonate (pH 9.6). Après lavage avec 0.5% Tween-20 (Merck, Hohenbrunn, D), les sérums sont dilués 50, 200 et 800 fois (solution de dilution: phosphate buffered saline (PBS) + 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma, St. Louis, Mo, U.S.A.) + 0.02% Tween-20)). 100 µl de chacun des sérums dilués sont ajoutés aux puits. Cette incubation dure 45 minutes à 37°C.

Après un second lavage, les IgG1, IgG2a et IgM spécifiques pour H1N1 sont incubées 30 minutes à 37°C avec 100 µl des anticorps (rat anti-souris) anti-IgG1 conjugués à la peroxydase (Serotec, Oxford, UK,) , IgG2a conjugués à la peroxydase (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.) et IgM conjugués à la biotine (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.), au préalable dilués dans le tampon PBS/BSA/Tween (dilutions : 250, 1000, et 500 fois respectivement). Pour les IgM, après un lavage supplémentaire, une 3<sup>ème</sup> incubation est nécessaire (30 min à 37°C) avec une solution 1/100 de streptavidine conjuguée à la peroxidase (Dako, Glostrup, DK).

- 10 Après lavage, 100 µl d'une solution de phénylène 1,2-diamine (OPD, Merck, Darmstad, RFA) sont ajoutés pour détecter la peroxydase conjuguées aux anticorps secondaires anti-IgG1 et anti-IgG2a (tandis que pour les IgM, le réactif utilisé est le 3',3',5',5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma, St. Louis, Mo, U.S.A.). Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, la réaction est stoppée par l'ajout
- 15 de 100 µl de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les absorbances sont mesurées à 490 nm avec un lecteur de plaques Bio Rad 3550.

### **Résultats**

Les résultats de chaque mesure à 490 nm sont exprimés en Unités Arbitraires (U.A) par ml. Ceci est possible par comparaison de chaque échantillon avec une référence préparée à partir de dilutions d'un pool d'échantillons à 28 jours provenant du groupe B (animaux injectés avec H1N1 seul). Par définition le pool d'échantillons dilué 50 fois est à la concentration de 1000 U.A./ml. Les résultats individuels sont ensuite corrigés selon le facteur de dilution correspondant (50, 200, ou 800 fois). On ne rapporte ici que la moyenne de chaque groupe et la déviation standard (SD).

25

Tab a) Immunoglobulines spécifiques contre H1N1 de la sous-classe IgG1 (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \*\* P<0.01 (tests Anova + Dunnetts (*two sided*))).

GROUPE	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	3 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0
B : H1N1	11161 $\pm$ 5755	53950 $\pm$ 23403
C : H1N1 + OM-294-MP	34411** $\pm$ 13719	228467** $\pm$ 109123
D : H1N1 + OM-294-DP	30101** $\pm$ 19061	382325** $\pm$ 201314
E : OM-294-MP	69 $\pm$ 34	59 $\pm$ 31
F : OM-294-DP	59 $\pm$ 21	38 $\pm$ 25

Tab b) Immunoglobulines spécifiques contre H1N1 de la sous-classe IgG2a (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \*\* P<0.01 (tests Anova + Dunnetts test (*two sided*))).

5

GROUPE	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
B : H1N1	26883 $\pm$ 20779	50352 $\pm$ 30846
C : H1N1 + OM-294-MP	179344** $\pm$ 139781	1622722** $\pm$ 986195
D : H1N1 + OM-294-DP	103630 $\pm$ 96257	681441 $\pm$ 1072710
E : OM-294-MP	1619 $\pm$ 743	1767 $\pm$ 1034
F : OM-294-DP	452 $\pm$ 584	782 $\pm$ 857

Tab c) Immunoglobulines spécifiques contre H1N1 de la sous-classe IgM (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \* P<0.05 et \*\*P<0.01 (Anova + Dunnetts test (*two sided*))).

GROUPE	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	22102 $\pm$ 5862	21531 $\pm$ 3693
B : H1N1	37787 $\pm$ 15001	57306 $\pm$ 26886
C : H1N1 + OM-294-MP	67936** $\pm$ 21334	95108 $\pm$ 38669
D : H1N1 + OM-294-DP	598100* $\pm$ 18324	92920 $\pm$ 26971
E : OM-294-MP	19065 $\pm$ 4069	18018 $\pm$ 4016
F : OM-294-DP	20756 $\pm$ 7160	20944 $\pm$ 9065

- 10 Ces résultats indiquent que les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP sont actifs dans le modèle étudié, puisqu'ils augmentent souvent de façon significative après une ou deux injections (voir figures 22, 23, 24) les anticorps spécifiques anti-H1N1

produits par la souris, ceci quelque soit la sous-classe d'immunoglobuline analysée (IgG1, IgG2a, et IgM).

**13. OM-294-MP et OM-294-DP combinés avec l'antigène ovalbumine :  
5 détermination d'anticorps spécifiques générés chez la souris après 1 ou 2  
administrations par voie sous-cutanée.**

***Protocole***

Le but de cette étude est de montrer l'effet adjuvant de OM-294-MP et OM-294-DP pour l'antigène ovalbumine (Fluka Chemie, Buchs, CH). Pour cela 50 souris BALB/c  
10 (femelles, 8 semaines d'âge au début du traitement) sont réparties dans les 5 groupes suivants :

GROUPES	ANTIGENE Final : 50 µg par animal/injection	ADJUVANTS Final : 50 µg par animal/injection	NaCl	VOLUME INJECTE
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: Ova	Ova (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: Ova + OM-294-MP	Ova (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: Ova + OM-294-DP	Ova (100 µl)	OM-294-DP (50 µl)	-	150 µl
E: OM-294-MP	-	OM-294-MP (50 µl)	100 µl	150 µl

Antigène : la solution mère d'ovalbumine est préparée à la concentration de 0.5  
15 mg/ml dans 0.9% NaCl.

Adjuvants : les solutions mères de OM-294-DP et OM-294-MP sont préparées à 1 mg/ml dans de l'eau pour injection, additionnée de 0.1% triéthanolamine pour l'OM-294-MP. Le témoin négatif est constitué d'une solution de 0.9% NaCl sans antigène.

20 Mélange antigène-adjuvant : les adjuvants sont placés 20 minutes à 37°C avant d'être vortexés pendant 3 minutes. Puis l'antigène et le NaCl (0.9%) sont ajoutés comme indiqué dans le tableau ci-dessus, et le mélange antigène/adjuvant est vortexé brièvement avant d'être mis sur un agitateur rotatif pendant 15 minutes à température ambiante, puis le tout est vortexé pendant 3 minutes

Immunisations : les injections ont lieu aux jours 0 et 14. Les mélanges indiqués dans le tableau précédent sont administrés par voie sous-cutanée (75 µl par flanc, au total 150 µl par animal). Les prises de sang ont lieu aux jours 14 et 28 (ponction orbitale).

- 5 Dosage des immunoglobulines anti-ovalbumine : les immunoglobulines sériques suivantes spécifiques pour l'ovalbumine sont déterminées en duplicats par ELISA : IgG1, IgG2a, et IgM. En bref, des plaques de micropuits (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) sont incubées (*coating overnight*) à 4°C avec 100 µl de ovalbumine (0.5 µg) dans un tampon bicarbonate (pH 9.6). Après lavage avec 0.5% Tween-20
- 10 (Merck, Hohenbrunn, D) les sérums sont dilués 50, 200 et 800 fois (solution de dilution: phosphate buffered saline (PBS) + 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) + 0.02% Tween-20). 100 µl de chacun des sérums dilués sont ajoutés aux puits. Cette incubation dure 45 minutes à 37°C.

- Après un second lavage, les IgG1, IgG2a et IgM spécifiques pour l'ovalbumine sont
- 15 incubées 30 minutes à 37°C avec 100 µl des anticorps (rat anti-souris) anti-IgG1 conjugués à la peroxydase (Serotec, Oxford, UK), IgG2a conjugués à la peroxydase (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.) et IgM conjugués à la biotine (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.), au préalable dilués dans le tampon PBS/BSA/Tween (dilutions : 250, 1000, et 500 fois respectivement). Pour les IgM, après un lavage
- 20 supplémentaire, une 3<sup>ème</sup> incubation est nécessaire (30 min à 37°C) avec une solution 1/100 de streptavidine conjuguée à la peroxidase (Dako, Glostrup, DK).

- Après lavage, 100 µl d'une solution de phénylène 1,2-diamine (OPD, Merck, Darmstadt, RFA) sont ajoutés pour détecter la peroxydase conjuguées aux anticorps secondaires anti-IgG1 et anti-IgG2a (tandis que pour les IgM, le réactif utilisé est la
- 25 3',3',5',5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). Après une incubation de 20 minutes à température ambiante (40 minutes pour le TMB), la réaction est stoppée par l'ajout de 100 µl de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les absorbances sont mesurées à 490 nm avec un lecteur de plaques Bio Rad 3550.

### **Résultats**

- 30 Les résultats de chaque mesure à 490 nm sont exprimés en Unités Arbitraires (U.A.) par ml. Ceci est possible par comparaison de chaque échantillon avec une référence préparé à partir de dilutions d'un pool d'échantillons à 28 jours provenant du groupe B (animaux injectés avec ovalbumine seule). Par définition le pool

d'échantillons dilué 50 fois est à la concentration de 1000 U.A./ml. Les résultats individuels sont ensuite corrigés selon le facteur de dilution correspondant (50, 200, ou 800 fois). Nous ne rapportons ici que la moyenne de chaque groupe et la déviation standard (SD).

5

Tab (a) Immunoglobulines spécifiques contre ovalbumine de la sous-classe IgG1 (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \*\* P<0.01 (test Anova + Dunnetts (two sided))).

GROUPES	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	6 $\pm$ 6	16 $\pm$ 12
B : Ova	728 $\pm$ 589	47743 $\pm$ 46294
C : Ova + OM-294-MP	4361** $\pm$ 2513	284121** $\pm$ 164822
D : Ova + OM-294-DP	3240** $\pm$ 1794	277025** $\pm$ 173737
E : OM-294-MP	19 $\pm$ 8	40 $\pm$ 69

Tab (b) Immunoglobulines spécifiques contre ovalbumine de la sous-classe IgG2a (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \* P<0.05 et \*\* P<0.01 (test Anova + Dunnetts (two sided))).

10

GROUPES	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	2996 $\pm$ 898	5414 $\pm$ 1554
B : Ova	5201 $\pm$ 1880	73162 $\pm$ 107954
C : Ova + OM-294-MP	9524 $\pm$ 6809	625663* $\pm$ 681232
D : Ova + OM-294-DP	18108** $\pm$ 14958	601434* $\pm$ 624166
E : OM-294-MP	11253 $\pm$ 12169	4192 $\pm$ 2104

Tab (c) Immunoglobulines spécifiques contre ovalbumine de la sous-classe IgM (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD).

GROUPES	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	14009 $\pm$ 6158	12288 $\pm$ 7136
B : Ova	19423 $\pm$ 13778	47998 $\pm$ 34035
C : Ova + OM-294-MP	21652 $\pm$ 9524	38240 $\pm$ 8822
D : Ova + OM-294-DP	25762 $\pm$ 10975	74399 $\pm$ 119781
E : OM-294-MP	19742 $\pm$ 5667	9827 $\pm$ 2021

15

Ces résultats indiquent que les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP sont actifs dans le modèle étudié, puisqu'ils augmentent significativement (pour les sous-classes IgG1 et IgG2a) après 1 ou 2 injections (voir figures 25, 26, 27) les anticorps spécifiques anti-ovalbumine produits par la souris.

5

**14. OM-294-MP et OM-294-DP combinés avec l'antigène TT (Tetanus Toxoid) : détermination d'anticorps spécifiques générés chez la souris après 1 ou 2 administrations par voie sous-cutanée.**

**10 Protocole**

Le but de cette étude est de montrer l'effet adjuvant de OM-294-MP et de OM-294-DP pour l'antigène TT (Massachusetts Biologic Laboratories, MA, U.S.A.). Pour cela 40 souris BALB/c (femelles, 8 semaines d'âge au début du traitement) sont réparties dans les 4 groupes suivants :

15

GROUPES	ANTIGENE Final : 20 µg par animal/injection	ADJUVANTS Final : 50 µg par animal/injection	NaCl (0.9%)	VOLUME INJECTE
A: NaCl	-	-	150 µl	150 µl
B: TT	TT (100 µl)	-	50 µl	150 µl
C: TT + OM-294-MP	TT (100 µl)	OM-294-MP (50 µl)	-	150 µl
D: TT + OM-294-DP	TT (100 µl)	OM-294-DP (50 µl)	-	150 µl

Antigène : la solution mère de TT est préparée à la concentration de 0.2 mg/ml dans 0.9% NaCl.

Adjuvants : les solutions mères de OM-294-DP et de OM-294-MP sont préparées à 1 mg/ml dans de l'eau pour injection, additionnée de 0.1% triethanolamine pour l'OM-294-MP. Le témoin négatif est constitué d'une solution de 0.9% NaCl sans antigène.

Mélange antigène-adjuvant : les adjuvants sont placés 20 minutes à 37°C avant d'être vortexés pendant 3 minutes. Puis l'antigène et le NaCl (0.9%) sont ajoutés comme indiqué dans le tableau ci-dessus, et le mélange antigène/adjuvant est vortexé brièvement avant d'être mis sur un agitateur rotatif pendant 15 minutes à température ambiante, puis le tout est vortexé pendant 3 minutes



Immunisations : les injections ont eu lieu aux jours 0 et 14. Les mélanges indiqués dans le tableau précédent sont administrés par voie sous-cutanée (75 µl par flanc, au total 150 µl par animal). Les prises de sang ont eu lieu aux jours 14 et 28 (ponction orbitale).

- 5 Dosage des immunoglobulines anti-TT : les immunoglobulines sériques spécifiques pour TT suivantes sont déterminées en duplicats par ELISA : IgG1, IgG2a, et IgM. Des plaques micropuits (NUNC Immunoplate, Roskilde, DK) sont incubées (coating overnight) à 4°C avec 100 µl de TT (0.5 µg) dans un tampon bicarbonate (pH 9.6). Après lavage avec 0.5% Tween-20 (Merck, Hohenbrunn, RFA) les sérums sont
- 10 dilués 50, 200 et 800 fois (solution de dilution: phosphate buffered saline (PBS) + 1 % d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) + 0.02% Tween-20)). 100 µl de chacun des sérums dilués sont ajoutés aux puits. Cette incubation dure 45 minutes à 37°C.

- Après un second lavage, les IgG1, IgG2a et IgM spécifiques pour TT sont incubées
- 15 30 minutes à 37°C avec 100 µl des anticorps (rat anti-souris) anti-IgG1 conjugués à la peroxydase (Serotec, Oxford, UK,) , IgG2a conjugués à la peroxydase (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.) et IgM conjugués à la biotine (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.), au préalable dilués dans le tampon PBS/BSA/Tween (dilutions : 250, 1000, et 500 fois respectivement). Pour les IgM, après un lavage
- 20 supplémentaire, une 3<sup>ème</sup> incubation est nécessaire (30 min à 37°C) avec une solution 1/100 de streptavidine conjuguée à la peroxidase (Dako, Glostrup, DK).

- Après lavage, 100 µl d'une solution de phénylène 1,2-diamine (OPD, Merck, Darmstad, RFA) sont ajoutés pour détecter la peroxydase conjuguées aux anticorps secondaires anti-IgG1 et anti-IgG2a (tandis que pour les IgM, le réactif utilisé est la
- 25 3',3',5',5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma; St. Louis, Mo)). Après une incubation de 20 minutes à température ambiante (40 minutes pour le TMB), la réaction est stoppée par ajout de 100 µl de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les absorbances sont mesurées à 490 nm avec un lecteur de plaques Bio Rad 3550.

### 30 **Résultats**

Les résultats de chaque mesure pour le immunoglobulines IgG1 et IgG2a à 490 nm sont exprimés en Unités Arbitraires (U.A) par ml. Ceci est possible par comparaison de chaque échantillon avec une référence préparée à partir de dilutions d'un pool

d'échantillons à 28 jours provenant du groupe B (animaux injectés avec TT seule). Par définition le pool d'échantillons dilué 50 fois est à la concentration de 1000 U.A./ml. Les résultats individuels sont corrigés selon le facteur de dilution correspondant (50, 200, ou 800 fois). On ne rapporte ici que la moyenne de chaque

5 groupe et la déviation standard (SD).

En ce qui concerne la détermination des IgM spécifiques pour TT, comme le « bruit de fond » de la mesure est trop élevé, aucune différence claire entre le groupe B (TT seule) et les groupes C et D (TT avec adjuvants) ne peut être décelée en mesurant les IgM spécifiques de la même manière que les IgG1 et les IgG2a. Par contre, on a

10 pu mesurer le titre des IgM spécifiques, en utilisant des dilutions successives de chaque échantillon (plutôt que les U.A. décrites précédemment), et on a pris en considération, pour chaque échantillon, la dilution maximale qui donne une absorbance supérieure à la moyenne + 3 SD des absorbances du groupe A (NaCl). Le titre ainsi obtenu indique le nombre de fois qu'un échantillon de sérum peut être

15 dilué avant que l'absorbance obtenue à 490 nm ne se confonde avec le bruit de fond. C'est cette dilution qui est rapportée dans le Tab (c) IgM ci-après.

Tab (a) Immunoglobulines spécifiques contre TT de la sous-classe IgG1 (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \*\*  $P < 0.01$  (Anova + Dunnetts test (two sided))).

GROUPES	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 1
B : TT	2871 $\pm$ 1633	34367 $\pm$ 15018
C : TT + OM-294-MP	8502** $\pm$ 2020	78506** $\pm$ 21660
D : TT + OM-294-DP	11620** $\pm$ 2348	136463** $\pm$ 41025

Tab (b) Immunoglobulines spécifiques contre TT de la sous-classe IgG2a (Unités arbitraires/ml  $\pm$  SD, \*\*  $P < 0.01$  (Anova + Dunnetts test (two sided))).

GROUPES	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	351 $\pm$ 506	539 $\pm$ 1046
B : TT	2547 $\pm$ 2539	61387 $\pm$ 82269
C : TT + OM-294-MP	8869 $\pm$ 6979	65881 $\pm$ 46635
D : TT + OM-294-DP	21969** $\pm$ 25067	148365 $\pm$ 134196

Tab (c) Titre des immunoglobulines spécifiques contre TT de la sous-classe IgM (dilutions pour chaque échantillon donnant un signal à 490 nm supérieur à celui de la moyenne + 3 SD de celui du groupe A ).

GROUPES	Jour 14	Jour 28
A : NaCl	Référence	Référence
B : TT	9 animaux <25 1 animal <50	10 animaux <25
C : TT + OM-294-MP	9 animaux <25 1 animal >1600	7 animaux <25 1 animal <100 2 animaux >1600
D : TT + OM-294-DP	7 animaux <25 1 animal <200 2 animaux >1600	10 animaux <25

- 5 Ces résultats indiquent que les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP sont actifs dans le modèle étudié, puisqu'ils augmentent souvent de façon significative après 1 ou 2 injections (voir figures 28, 29) les anticorps spécifiques IgG1 et IgG2a anti-TT, produits par la souris. Par contre seuls quelques animaux ont produit des IgM spécifiques contre TT.

10

**15. Evaluation des propriétés de l'adjuvant OM-294-MP dans un modèle d'immunisation chez la souris CBA par voie s.c. avec l'antigène de *Leishmania* gp63.**

**15 Protocole**

- Des souris CBA reçoivent dans la queue à 8 jours d'intervalle deux injections sous-cutanées de 2 µg de gp63. L'adjuvant OM-294-MP est mélangé avec les deux doses d'antigène, le BCG est mélangé seulement avec la première. Chaque souris reçoit 2 x 50 µg d'OM-294-MP ou 200 µg de BCG. Un groupe témoin est injecté avec l'antigène seul (sans adjuvant). Dix jours après la deuxième injection, les cellules des ganglions lymphatiques inguinaux et périaortiques (groupes de 3 souris) sont mis en culture et la réponse proliférative à l'antigène purifié gp63 évaluée par mesure de l'incorporation de thymidine (<sup>3</sup>H-TdR). La production des cytokines IFN-γ et IL-4 in
- 20

vitro par les lymphocytes ganglionnaires restimulés in vitro par l'antigène de gp63 a également été déterminée par ELISA (kits IFN- $\gamma$  MIF00 et IL-4 M4000, R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) sur un prélèvement de chacun des surnageants des cultures des lymphocytes ganglionnaires avant l'ajout de  $^3\text{H}$ -TdR.

- 5 Les valeurs reportées dans les tableaux représentent pour l'incorporation de  $^3\text{H}$ -TdR, la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard (triplicats) exprimée en cpm et pour les cytokines dans les surnageants, la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard (triplicats) exprimée en pg par ml.

10 Antigène : la solution mère de gp63 est préparée à la concentration de 40  $\mu\text{g/ml}$  dans 0.9% NaCl.

Adjuvants : la solution mère de OM-294- MP est préparée à 1 mg/ml dans de l'eau pour injection additionnée de 0.1% triethanolamine. Le contrôle négatif est constitué d'une solution de PBS sans antigène.

15 Mélange antigène-adjuvant : les adjuvants sont placés 10 minutes à 37°C avant d'être vortexés pendant 3 minutes. Puis l'antigène (1 volume) et le l'adjuvant (1 volume) sont mélangés et vortexés brièvement avant d'être mis à incuber pendant 20 minutes à 37°C, puis le tout est vortexé pendant 3 minutes

### Résultats

20 Chez des souris immunisées avec l'antigène gp63, l'adjuvant OM-294-MP induit une meilleure réponse de prolifération lymphocytaire (Tab (a) et Fig 30 (a)) que le BCG. En effet, par rapport aux cultures provenant d'animaux immunisés sans adjuvant, l'augmentation de la prolifération est comprise entre 3.1 et 6 pour le produit OM-294-MP alors qu'elle ne dépasse pas 3.5 dans le cas du BCG (2.6 à 3.5).

25 Dans ces mêmes cultures lymphocytaires, la production de cytokines est mesurée dans le surnageant (Tab (b) et Fig 30 (b)). Il est observé que l'antigène gp63 induit la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en quantités équivalentes que les souris sont traitées par l'adjuvant OM-294-MP ou par le BCG. Par contre, l'adjuvant OM-294-MP semble prédisposer les lymphocytes immuns (anti-gp63) à sécréter des quantités importantes d'IL-4, alors que les lymphocytes de souris traitées par le BCG sécrètent des quantités  
30 faibles, voire indétectables de cette cytokine.

Tableau (a). Effet de l'adjuvant OM-294-MP sur la réponse immunitaire contre l'antigène gp63, mesurée par la prolifération de lymphocytes T murins en réponse à l'antigène gp63 *in vitro*.

gp63 <i>in vitro</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sans adjuvant (cpm $\times 10^{-3}/\text{ml}$ )	OM-294-MP (cpm $\times 10^{-3}/\text{ml}$ )	BCG (cpm $\times 10^{-3}/\text{ml}$ )
0	$1.4 \pm 0.4$	$2.8 \pm 0.7$	$5.3 \pm 1.1$
0.16	$18 \pm 5$	$65 \pm 11$	$47 \pm 9$
0.31	$17 \pm 5$	$92 \pm 11$	$57 \pm 17$
0.62	$16 \pm 4$	$93 \pm 13$	$54 \pm 13$
1.25	$13 \pm 2$	$39 \pm 7$	$44 \pm 9$

Les valeurs reportées dans le Tab (a) représentent la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard de l'incorporation (cultures en triplicats).

Tableau (b). Effet de l'adjuvant OM-294-MP administré *in vivo* avec l'antigène gp63 sur la production *in vitro* de cytokines par les lymphocytes ganglionnaires.

Concentration de IFN- $\gamma$ (pg/ml)			
gp63 $\mu\text{g/ml}$	Sans adjuvant	294-MP	BCG
0	< 9	< 9	27
0.3	78	135	200
0.6	38	120	105
Concentration de IL-4 (pg/ml)			
gp63 $\mu\text{g/ml}$	Sans adjuvant	294-MP	BCG
0	< 8	< 8	< 8
0.3	< 15	125	15
0.6	< 8	83	< 8

L'adjuvant OM-294-MP potentialise chez des souris CBA immunisées avec gp63 (un antigène amphiphile du parasite *Leishmania*) une réponse T spécifique évaluée *in vitro* par la mesure de la prolifération lymphocytaire et de la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 induite par l'antigène.

**16. Efficacité de l'adjuvant OM-294-MP au cours de la réponse primaire T anti-LmCPb dans un modèle d'immunisation chez la souris CBA par voie s.c. avec l'antigène de *Leishmania mexicana* LmCPb.**

**Protocole**

- 5 Des souris CBA ont reçu dans la queue une seule injection de 2 µg de LmCPb avec ou sans 50 µg de l'adjuvant OM-294-MP. Un groupe contrôle a reçu une injection de tampon physiologique (non immunisé). Onze jours plus tard, les cellules des ganglions lymphatiques inguinaux et périaortiques (groupes de 3 souris) sont mises en culture et la réponse proliférative à l'antigène purifié LmCPb, à une préparation
- 10 totale d'amastigotes de *Leishmania mexicana* et à la concanavaline A (Con A) est évaluée par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-TdR). La production des cytokines IFN-γ et IL-4 par les lymphocytes ganglionnaires restimulés in vitro par l'antigène LmCPb de *Leishmania mexicana* ou par les amastigotes est également
- 15 déterminée par ELISA (kits IFN-γ MIF00 et IL-4 M4000, R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) sur un prélèvement de chacun des surnageants des cultures des lymphocytes ganglionnaires avant l'ajout de <sup>3</sup>H-TdR.

Les valeurs reportées dans les tableaux représentent pour l'incorporation de <sup>3</sup>H-TdR, la moyenne arithmétique ± la déviation standard (triplicats) exprimée en cpm et pour les cytokines dans les surnageants, la moyenne arithmétique ± la déviation standard

20 (triplicats) exprimée en pg par ml.

Antigène : la solution mère de LmCPb est préparée à la concentration de 40 µg/ml dans le PBS deux fois concentré.

Adjuvants : la solution mère d'OM-294-MP est préparée à 1 mg/ml dans de l'eau pour injection additionnée de 0.1% triéthanolamine. Le contrôle négatif est constitué

25 d'une solution de PBS sans antigène.

Mélange antigène-adjuvant : les adjuvants sont mis 10 minutes à 37°C avant d'être vortexés pendant 3 minutes. Puis l'antigène (1 volume) et l'adjuvant (1 volume) sont mélangés et vortexés brièvement avant d'être mis à incuber pendant 20 minutes à 37°C, puis le tout est vortexé pendant 3 minutes

30 **Résultats**

En l'absence de tout stimulant ajouté au milieu de culture, l'adjuvant OM-294-MP favorise le développement de lymphocytes proliférant spontanément (Tab (a) et Fig 31 (a)) et sécrétant des traces d'INF-γ (Tab (b) et Fig 31 (b)). Cette réponse est

fortement potentialisée lorsque l'antigène purifié LmCPb ou un extrait total de parasites est ajouté aux cultures. Dans cette expérience, il y influence nette de l'adjuvant sur l'induction de lymphocytes sensibilisés (anti-LmCPb) capables de sécréter des quantités importantes d'IL-4 (Tab. (b) et Fig 31 (b)).

5

**Tableau (a). Réponse proliférative *in vitro* de cellules ganglionnaires immunisées *in vivo* avec LmCPb : effet de l'adjuvant OM-294-MP**

Antigène <i>in vitro</i>	Incorporation de $^3\text{H-TdR}$ (cpm $\times 10^{-3}$ /ml)		
	Non immunisé	Sans Adjuvant	OM-294-MP
Pas de stimulant	0.9 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.7	11 $\pm$ 2
LmCPb 0.6 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1	19 $\pm$ 4
LmCPb 1.7 $\mu\text{g/ml}$	0.9 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 1.6	40 $\pm$ 4
LmCPb 5 $\mu\text{g/ml}$	1.3 $\pm$ 0.8	7.2 $\pm$ 0.6	80 $\pm$ 5
LmCPb 15 $\mu\text{g/ml}$	2.6 $\pm$ 0.4	16.2 $\pm$ 2.1	140 $\pm$ 10
Amastigotes $1.9 \times 10^{-6}/\text{ml}$	0.8 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	44 $\pm$ 7
Amastigotes $6 \times 10^{-6}/\text{ml}$	1.5 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.6	79 $\pm$ 6
Amastigotes $17 \times 10^{-6}/\text{ml}$	2.9 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.6	119 $\pm$ 4
Con A 5 $\mu\text{g/ml}$	123 $\pm$ 33	193 $\pm$ 17	196 $\pm$ 10

Tableau (b). Sécrétion *in vitro* de cytokines par les lymphocytes ganglionnaires immunisés *in vivo* avec LmCPb : Effet de l'adjuvant OM-294-MP sur la réponse primaire.

Production de IFN- $\gamma$ (pg/ml)			
Stimulant <i>in vitro</i>	Non immunisé	Sans adjuvant	OM-294-MP
Pas de stimulant	< 9	< 9	25
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	< 9	46	480
Amastigotes 17 x 10 <sup>-6</sup> /ml	< 9	95	320
Con A 5 $\mu$ g/ml	> 1800	> 1800	> 1800
Production de IL-4 (pg/ml)			
Stimulant <i>in vitro</i>	Non immunisé	Sans adjuvant	OM-294-MP
Pas de stimulant	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	< 8	< 8	130
Amastigotes 17 x 10 <sup>-6</sup> /ml	< 8	< 8	65
Con A 5 $\mu$ g/ml	92	190	360

- 5 L'adjuvant OM-294-MP est aussi très efficace au cours de la réponse T primaire (suite à une seule injection vaccinale). Les caractéristiques de l'effet adjuvant sur cette réponse (augmentation de la prolifération lymphocytaire, induction de cytokines) sont similaires à celles observées lors de la réponse à deux injections vaccinales.

10

**17. Evaluation des propriétés des adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP dans un modèle d'immunisation chez la souris CBA par voie s.c. avec l'antigène de *Leishmania mexicana* LmCPb: comparaison avec le BCG**

15 **Protocole**

Des souris CBA (8 souris par groupe) ont reçu dans la queue à 8 jours d'intervalle deux injections sous-cutanées de 3 à 5  $\mu$ g de LmCPb purifié. Les adjuvants OM-294-DP, OM-294-MP sont mélangés avec les deux doses d'antigène, alors que le BCG a été mélangé seulement avec la première. Chaque souris a reçu 2 x 50  $\mu$ g d'adjuvant OM ou 200  $\mu$ g de BCG. Huit jours après la deuxième injection les

20



ganglions lymphatiques inguinaux et périaortiques (3 souris par groupe) sont prélevés et les cellules mises en culture pour déterminer la réponse proliférative à l'antigène purifié LmCPb, ou respectivement, la réponse proliférative à une préparation totale d'amastigotes *Leishmania mexicana* ou à la concanavaline A (Con A). La réponse proliférative est évaluée par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ( $^3\text{H}$ -TdR). La production des cytokines IFN- $\gamma$  et IL-4 par les lymphocytes ganglionnaires restimulés in vitro par l'antigène LmCPb de *Leishmania mexicana* ou par les amastigotes ou par la Con A est déterminée par ELISA (kits IFN- $\gamma$  MIF00 et IL-4 M4000, R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) sur un prélèvement de chacun des surnageants des cultures des lymphocytes ganglionnaires avant l'ajout de  $^3\text{H}$ -TdR.

Les valeurs reportées dans les tableaux représentent pour les titres d'anticorps, la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard exprimés en % du standard, pour l'incorporation de  $^3\text{H}$ -TdR, la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard (triplicats) exprimée en cpm et pour les cytokines dans les surnageants, la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard (triplicats) exprimée en pg par ml.

Antigène : la solution mère de LmCPb est préparée à une concentration comprise entre 60 et 100  $\mu\text{g/ml}$  dans 0.9% NaCl.

Adjuvants : les solutions mères de OM-294-DP et OM-294-MP sont préparées à 1 mg/ml dans de l'eau pour injection, additionnée de 0.1% triethanolamine pour l'OM-294-MP. Le témoin négatif est constitué d'une solution de PBS sans antigène.

Mélange antigène-adjuvant : les adjuvants sont placés 10 minutes à 37°C avant d'être vortexés pendant 3 minutes. Puis l'antigène (1 volume) et l'adjuvant 0.9% (1 volume) sont mélangés et vortexés brièvement avant d'être mis à incuber pendant 20 minutes à 37°C, puis le tout est vortexé pendant 3 minutes

### **Résultats**

Chez les souris immunisées avec l'antigène LmCPb (Tab (a) et (b) et Fig 32 (a, b)), les produits OM-294-MP et OM-294-DP produisent un effet semblable à celui qui a été observé chez les souris développant une réponse immune contre gp63. Ainsi, en présence de LmCPb (15  $\mu\text{g/ml}$ ), les cultures proviennent des souris immunisées avec l'antigène plus les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP présentent une prolifération respectivement 23 et 28 fois plus intense que les cultures proviennent de souris ayant reçu l'antigène seul (sans adjuvant). L'influence du BCG dans ces

conditions est moindre, puisque l'augmentation de la prolifération est de 11 fois seulement. Des effets analogues se retrouvent que les cultures sont stimulées avec l'antigène purifié ou avec un extrait total du parasite *Leishmania*, et à toutes les concentrations d'antigène testées.

- 5 La production d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'antigène LmCPb a tendance à être un peu plus élevée avec le produit OM-294-DP qu'avec le BCG (Tab (b) et Fig 32 (b)). Il est à noter que dans cette expérience, les lymphocytes prolifèrent et sécrètent des quantités importantes d'IFN- $\gamma$  même si de l'antigène n'est pas ajouté au milieu de culture. Dans ce cas aussi l'adjuvant OM-294-DP tend à être un peu plus efficace
- 10 que le BCG. Une différence nette entre les adjuvants OM-294-MP, respectivement OM-294-DP et le BCG apparaît comme précédemment pour ce qui concerne le développement de lymphocytes capables de produire de l'IL-4. La quantité d'IL-4 produite sous l'effet des adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP est importante puisqu'elle équivaut à la quantité sécrétée par des lymphocytes exposés à la Con A,
- 15 un puissant stimulant non spécifique des lymphocytes (voir Tab (a) et (b)).

Tableau (a): Réponse proliférative *in vitro* de cellules ganglionnaires provenant de souris immunisées *in vivo* avec LmCPb : effet de différents adjuvants.

Stimulant <i>in vitro</i>	Incorporation de $^3\text{H-TdR}$ (cpm $\times 10^{-3}$ /ml)			
	Sans adjuvant	OM-294-DP	OM-294-MP	BCG
Pas de stimulant	1.7 $\pm$ 0.6	21.8 $\pm$ 2.2	17.1 $\pm$ 2.5	18.6 $\pm$ 4.8
LmCPb 0.6 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\pm$ 0.3	40.9 $\pm$ 12.7	22.9 $\pm$ 2.8	19.0 $\pm$ 7.4
LmCPb 1.7 $\mu\text{g/ml}$	2.4 $\pm$ 0.1	57.2 $\pm$ 10.9	34.1 $\pm$ 4.1	39.8 $\pm$ 5.7
LmCPb 5 $\mu\text{g/ml}$	2.8 $\pm$ 0.6	70.2 $\pm$ 9.2	70.3 $\pm$ 6.4	44.0 $\pm$ 10.4
LmCPb 15 $\mu\text{g/ml}$	4.3 $\pm$ 0.1	100.0 $\pm$ 6.5	124.2 $\pm$ 12.0	46.2 $\pm$ 0.3
Amastigotes 2 $\times 10^6$ /ml	2.4 $\pm$ 0.6	61.0 $\pm$ 1.7	28.4 $\pm$ 8.3	24.4 $\pm$ 4.3
Amastigotes 6 $\times 10^6$ /ml	2.3 $\pm$ 0.7	81.1 $\pm$ 5.5	66.1 $\pm$ 4.5	23.6 $\pm$ 2.5
Amastigotes 17 $\times 10^6$ /ml	1.7 $\pm$ 0.4	78.2 $\pm$ 7.8	68.7 $\pm$ 2.3	23.4 $\pm$ 4.0
Con A 5 $\mu\text{g/ml}$	188.1 $\pm$ 21.0	135.9 $\pm$ 3.7	151.4 $\pm$ 3.7	119.7 $\pm$ 28.5

- 20 Les valeurs reportées dans le tableau représentent la moyenne arithmétique  $\pm$  la déviation standard de l'incorporation (cultures en triplicats).

**Tableau (b): Production de cytokines *in vitro* par des lymphocytes ganglionnaires de souris immunisés *in vivo* par l'antigène LmCPb : effet de différents adjuvants.**

Concentration de IFN- $\gamma$ en (pg/ml)				
Stimulant <i>in vitro</i>	Sans adjuvant	OM-294-DP	OM-294-MP	BCG
Pas de stimulant	< 9	460	240	280
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	44	520	360	460
Amastigotes 17 x $10^{-6}$ /ml	14	> 600	> 600	480
Con A 5 $\mu$ g/ml	1200	1200	1900	> 3000
Concentration de IL-4 en (pg/ml)				
Stimulant <i>in vitro</i>	Sans adjuvant	OM-294-DP	OM-294-MP	BCG
Pas de stimulant	< 15	< 8	< 8	< 8
LmCPb 15 $\mu$ g/ml	< 15	110	88	36
Amastigotes 17 x $10^{-6}$ /ml	< 8	130	110	29
Con A 5 $\mu$ g/ml	40	230	85	105

Les adjuvants OM-294-MP et OM-294-DP potentialisent de façon efficace la réponse immune à un antigène soluble de *Leishmania*, la protéase LmCPb. Cela se marque *in vitro* par une augmentation de la réponse proliférative suivie de l'induction de la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 en quantités significatives.

## EXEMPLE VI

### 10 Solution aqueuse injectable

Composé de l'exemple III 1 g  
 Polysorbate 80 0.2 g  
 Chlorure de sodium 9 g  
 Eau distillée pour injection qsp 1'000 ml

15 La solution est ajustée à pH 7.4 avec HCl 0.1M et puis elle est stérilisée par filtration sur membrane 0.22  $\mu$ m Steritop Express 1000 (membrane PES, 90 mm, SCGP T10 RE, Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.). La solution stérile est répartie en ampoules stériles de 1 ml.

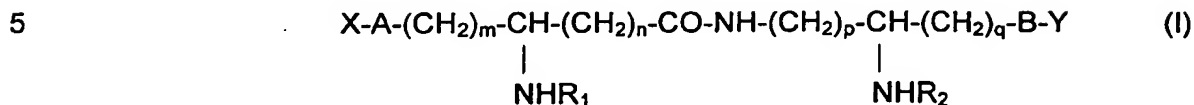
**Lyophilisat**

	Composé de l'exemple IV	2 g
	Polysorbate 80	0.2 g
5	Chlorure de sodium	9 g
	Mannitol	10 g
	Acide ascorbique	0.1 g
	Eau distillée pour injection qsp	1'000 ml

- 10 La solution est ajustée à pH 7.4 avec HCl 0.1M, puis elle est stérilisée par filtration sur membrane 0.22 µm Steritop Express 1000 (membrane PES, 90 mm, SCGP T10 RE, Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.). La solution stérile est répartie en flacons multidose stériles à raison de 1 ml par flacon, puis la solution est lyophilisée.

## REVENDICATIONS

## 1. Pseudodipeptides N-acylés répondant à la formule générale I



dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé par les hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>) thio.

les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide choisi parmi les groupements

-carboxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]

-CH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COOH] [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH] avec m = 0 à 5 et n = 0 à 5

-phosphono [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]

-dihydroxyphosphoryloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyl]

-diméthoxyphosphoryle

-phosphono

-hydroxysulfonyl

-hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]

-hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]

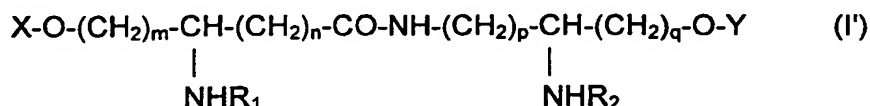
sous forme neutre ou chargée,

avec la limitation que l'un au moins des substituants X et Y représente un groupe acide défini comme ci-dessus, sous forme neutre ou chargée,

A et B indépendamment l'un de l'autre représentent un atome d'oxygène, un atome de soufre ou le groupe imino -NH-.

2. Les sels des composés de formule générale I selon la revendication 1, lorsque X et/ou Y sont un groupe acide, salifiés avec une base minérale ou organique, de préférence thérapeutiquement compatible

- 5 3. Les composés de formule générale I' selon la revendication 1 ou 2 à savoir



- 10 dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants choisis dans le groupe formé de hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>) thio.

- 15 les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10  
le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10  
X et Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe phosphono

- 20 4. Un composé selon l'une des revendications 1 à 3 à savoir un 1 et/ou 10-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxy-tétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino)4-oxo5-azadécane-1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.

- 25 5. Un composé selon l'une des revendications 1 à 3, à savoir un 1,10-bis-(dihydrogénophosphate) de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane-1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.

- 30 6. Un composé selon l'une des revendications 1 à 3, à savoir le 1,10-bis (dihydrogénophosphate) de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.

7. Un composé selon l'une des revendications 1 à 3, à savoir un mono 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 9-(3-hydroxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.

5

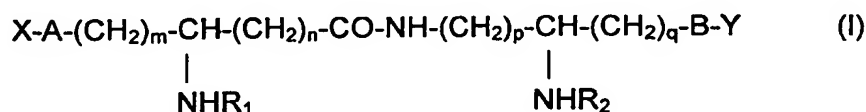
8. Un composé selon l'une des revendications 1 à 3, à savoir un mono 1-dihydrogénophosphate de 3-(3-hydroxytétradécanoylamino) 9-(3-dodécanoyloxytétradécanoylamino) 4-oxo-5-azadécane 1,10-diol et ses sels d'addition avec une base minérale ou organique.

10

9. Les composés de formule générale I selon la revendication 1, contenant des éléments de configuration R ou S, ou racémiques.

10. Un procédé d'obtention des pseudodipeptides de formule générale I selon la revendication 1

15



20

dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en  $C_1$ - $C_{24}$ ) thio,

25

dans laquelle l'un au moins des substituants  $R_1$  ou  $R_2$  est un groupe acyloxyacyle

les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

$X$  et  $Y$  représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide choisi dans le groupe constitué par

30

-carboxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyle}]$

-CH- $[(CH_2)_m\text{COOH}] [(CH_2)_n\text{COOH}]$  avec  $m = 0$  à 5 et  $n = 0$  à 5

-phosphono  $[(C_1-C_5)\text{alkyle}]$

-dihydroxyphosphoryloxy  $[(C_1-C_5)\text{alkyle}]$

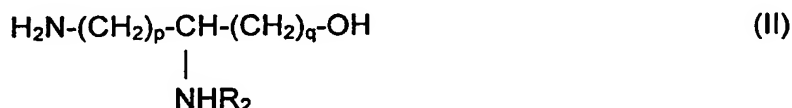
-diméthoxyphosphoryle  
 -hydroxysulfonyle  
 -hydroxysulfonyl [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]  
 -hydroxysulfonyloxy [(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkyle]  
 -phosphono

sous forme neutre ou chargée,

avec la limitation que l'un au moins des substituants X et Y représente un groupe acide défini comme ci-dessus, sous forme neutre ou chargée,

A et B ont les significations fournies antérieurement

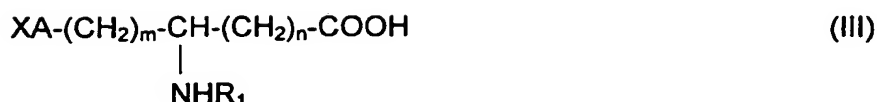
caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en (q+1) et en ω de l'acide diaminé de formule H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CHNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q-1</sub>COOH par un réactif de blocage labile par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre, à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en position (q+1) que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule R<sub>2</sub> OH dans laquelle R<sub>2</sub> est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir une diamine de formule générale II



dans laquelle R<sub>2</sub> représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus, p et q représentent un nombre entier variant de 1 à 10

que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d'un ω-hydroxy, -amino ou -thio amino acide de formule générale III





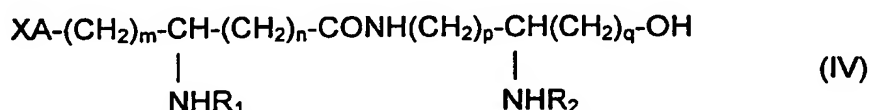
dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme précédemment  
 $m$  est un nombre entier variant de 1 à 10

$n$  est un nombre entier variant de 0 à 10

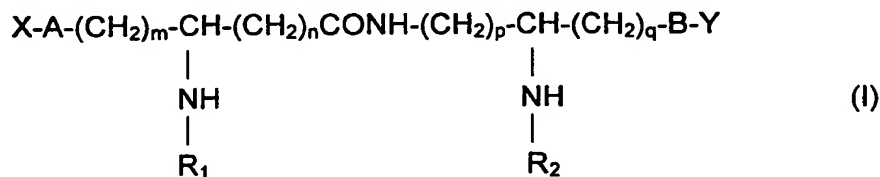
A est de l'oxygène, du soufre ou un groupe imino NH

et X est un radical acide défini comme précédemment présent éventuellement sous forme estérifiée

pour former le pseudodipeptide de formule générale IV

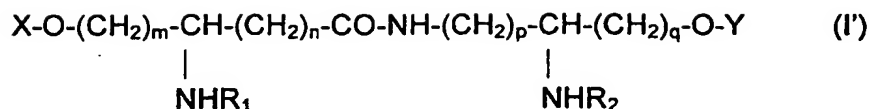


dans laquelle les substituants et les descripteurs  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis comme précédemment, dont on peut -si désiré- substituer, alkyliser ou acyler la fonction alcool par un réactif de substitution, d'alkylation ou d'acylation, en présence d'un agent de couplage, si nécessaire, et soumettre à une hydrogénation catalytique ou à une autre méthode de déprotection de façon à obtenir le dérivé de formule générale I



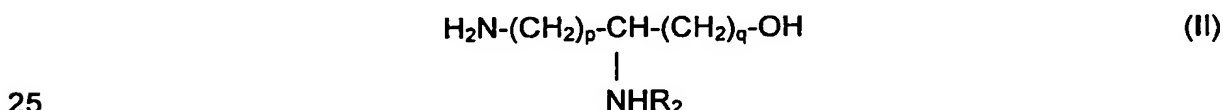
dans laquelle les substituants et les descripteurs A, B, X, Y,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $n$ ,  $m$ ,  $p$  et  $q$  ont les significations fournies antérieurement.

11. Un procédé d'obtention des phosphopseudodipeptides de formule générale I' selon l'une des revendications 1 ou 2

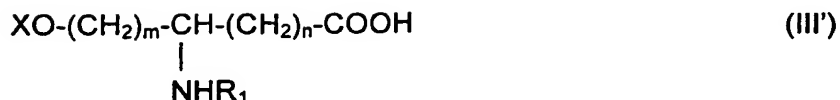


- 5 dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en  $C_1 - C_{24}$ ) thio
- 10 les descripteurs  $m$ ,  $p$  et  $q$  pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10
- le descripteur  $n$  pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10
- $X$  et  $Y$  représentent chacun un hydrogène ou un groupe phosphono sous forme neutre ou chargée,

- 15 caractérisé en ce qu'on bloque les fonctions amine en  $(q+1)$  et en  $\omega$  du diamino acide de formule  $\text{H}_2\text{N(CH}_2\text{)}_p\text{CHNH}_2\text{(CH}_2\text{)}_{q-1}\text{COOH}$  par des réactifs de blocage labiles par acidolyse et hydrogénolyse, respectivement, soumet la fonction carboxylique restée libre à l'action d'un agent réducteur pour former l'alcool correspondant, libère la fonction amine en position  $(q+1)$  que l'on acyle à l'aide d'un dérivé fonctionnel d'un acide carboxylique de formule  $\text{R}_2\text{OH}$  dans laquelle
- 20  $\text{R}_2$  est défini comme précédemment, puis libère la fonction amine terminale par hydrogénolyse pour obtenir l'amino alcool de formule générale II



- 25 dans laquelle  $\text{R}_2$  représente un groupe acyle dérivé d'acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants définis comme ci-dessus,
- 30  $p$  et  $q$  représentent un nombre entier variant de 1 à 10
- que l'on condense en présence d'un agent de condensation peptidique dans un solvant inerte avec un dérivé d' $\omega$ -hydroxy amino acide de formule générale III'



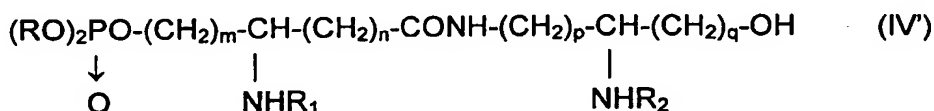
dans laquelle  $R_1$  est un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou non-saturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants

$m$  est un nombre entier variant de 1 à 10

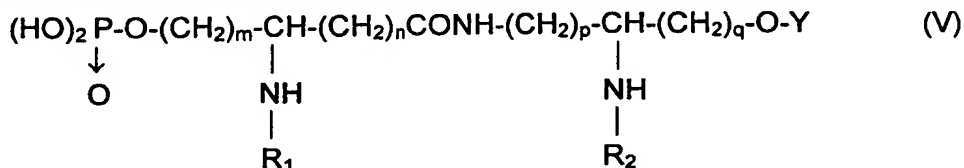
$n$  est un nombre entier variant de 0 à 10

et  $X$  est un radical dialkyloxy- ou diaryloxy-phosphoryle de formule  $(\text{RO})_2 \text{P}$   
 $\downarrow$   
 $\text{O}$

pour former le pseudodipeptide de formule générale IV'



dans laquelle les substituants  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $p$  et  $q$  sont définis comme précédemment, et  $R$  est un radical labile par hydrogénolyse, dont on peut -si désiré- phosphoryler la fonction alcool par un agent de phosphorylation en présence d'un agent de couplage, si nécessaire, et soumettre à une hydrogénation catalytique en deux étapes pour débloquent la fonction alcool éventuellement présente sur le groupe acyle  $R_2$  et la fonction phosphate puis débloquent par hydrogénolyse la deuxième fonction phosphate éventuellement présente, de façon à obtenir le dérivé de formule générale V



dans laquelle  $Y$  représente soit un hydrogène soit un groupe phosphono.

12. Procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, dans lequel on effectue l'étape supplémentaire de salification à l'aide d'une base minérale ou organique .

13. Un procédé selon l'une des revendications 10 à 12, dans lequel l'étape de salification est effectuée avec une base minérale ou organique thérapeutiquement compatible.

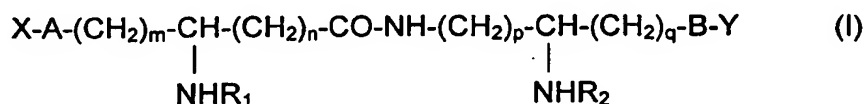
5 14. Un procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, dans lequel l'acide carboxylique R<sub>1</sub>OH est l'acide 3-dodécanoyloxytétradécanoïque.

15. Un procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, dans lequel l'acide carboxylique R<sub>2</sub>OH est l'acide 3-hydroxytétradécanoïque.

10

16. Compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I selon la revendication 1

15



20

dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe acyle dérivé d'un acide carboxylique ayant de 2 à 24 atomes de carbone, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, non-substitué ou portant un ou plusieurs substituants hydroxyle, alkyle, alkoxy, acyloxy, amino, acylamino, acylthio et (alkyle en C<sub>1</sub> - C<sub>24</sub>) thio

les descripteurs m, p et q pouvant prendre une valeur allant de 1 à 10

le descripteur n pouvant prendre une valeur allant de 0 à 10

25

X et/ou Y représentent chacun un hydrogène ou un groupe acide sous forme neutre ou chargée

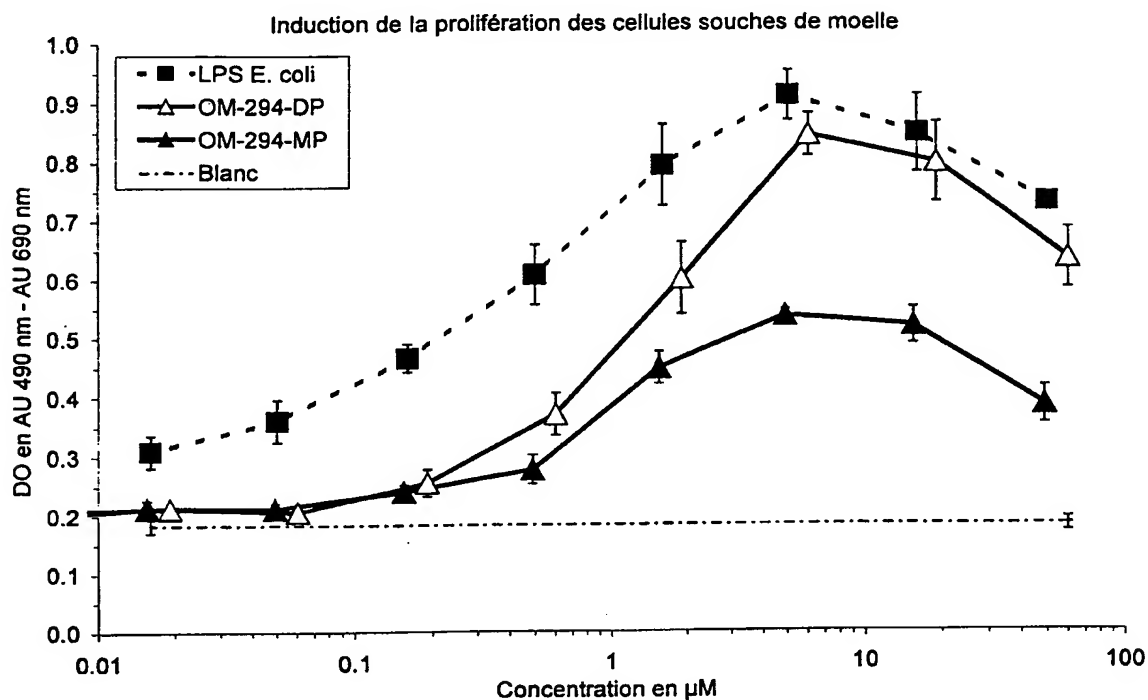
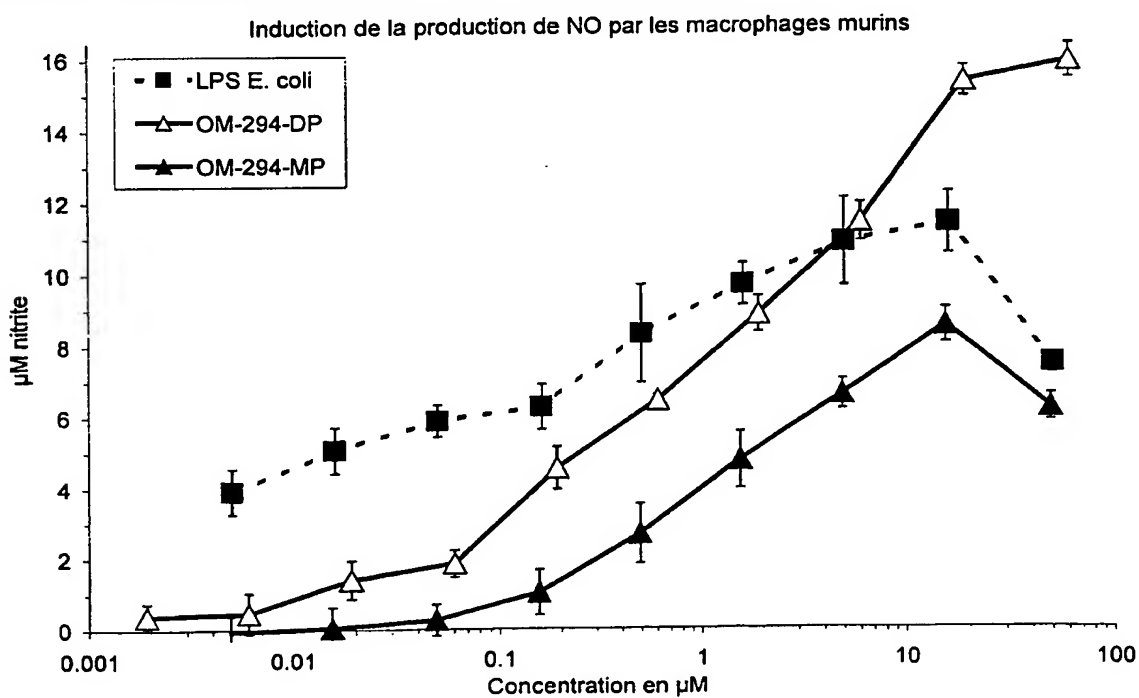
A et B semblables ou différents l'un de l'autre, sont de l'oxygène, du soufre ou un groupe imino

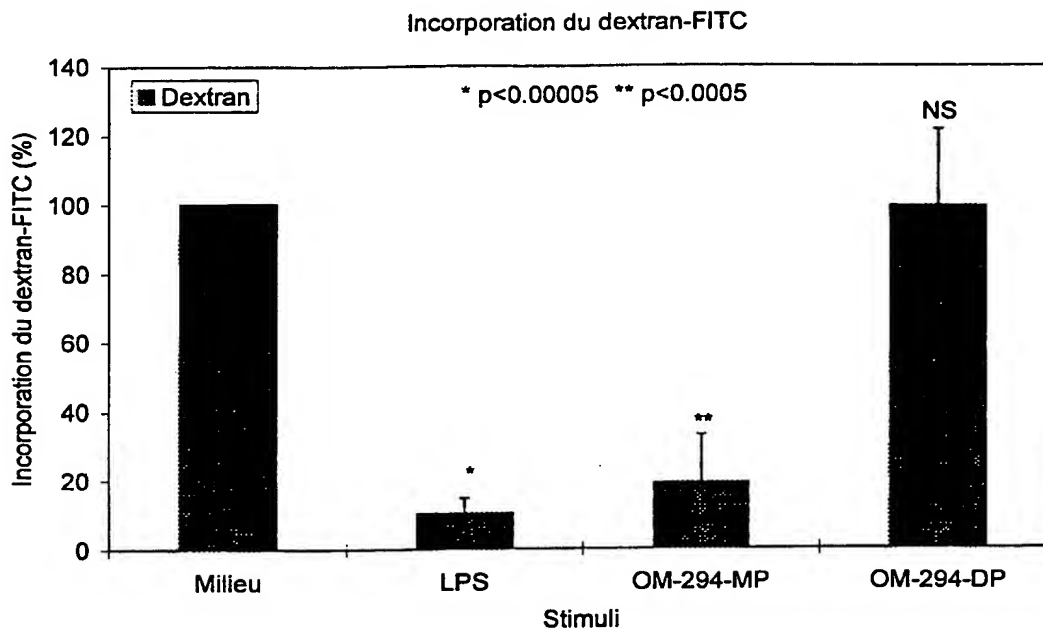
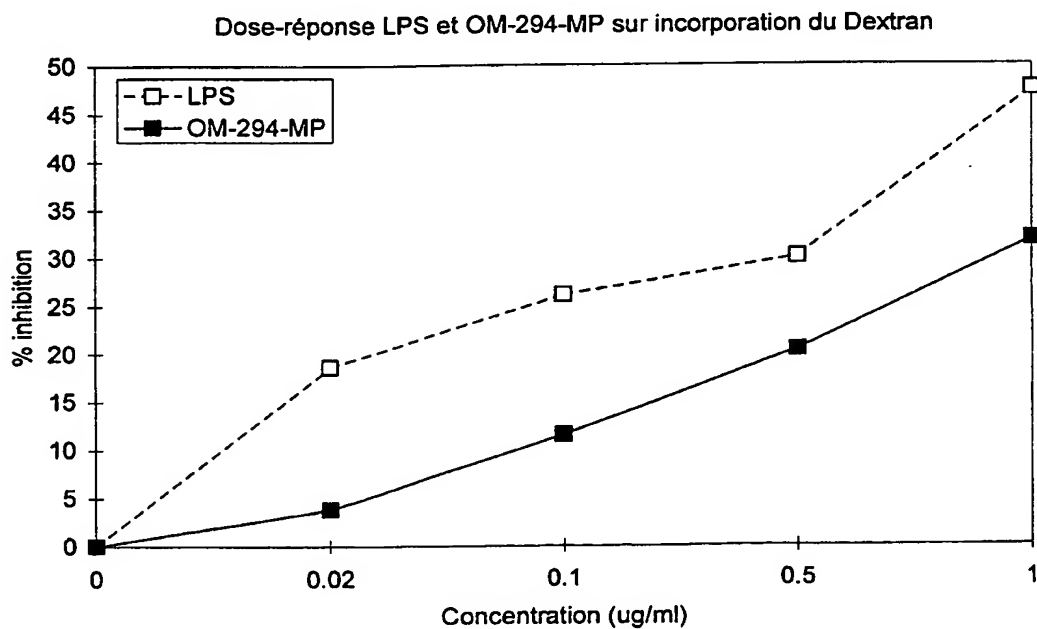
en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable.

30

17. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 16, dans lesquelles le composé de formule I est un de ceux pour lesquels X et/ou Y représentent un radical phosphono et A et B représentent de l'oxygène.

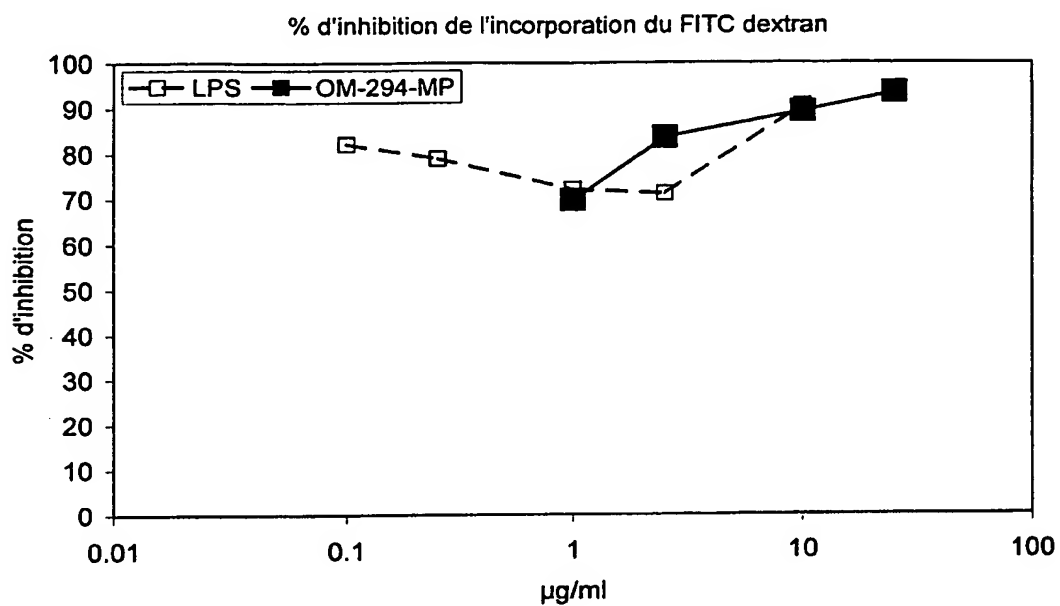
18. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17 dans lesquelles le principe actif est sous forme salifiée avec une base minérale ou organique thérapeutiquement compatible.
- 5 19. Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications 16 à 18, dans lesquelles le principe actif est sous forme énantiomériquement pure ou sous forme de mélange de stéréoisomères.

**FIGURE 1****Induction de la prolifération des cellules souches de moelle****FIGURE 2****Induction de la production de NO par les macrophages murins**

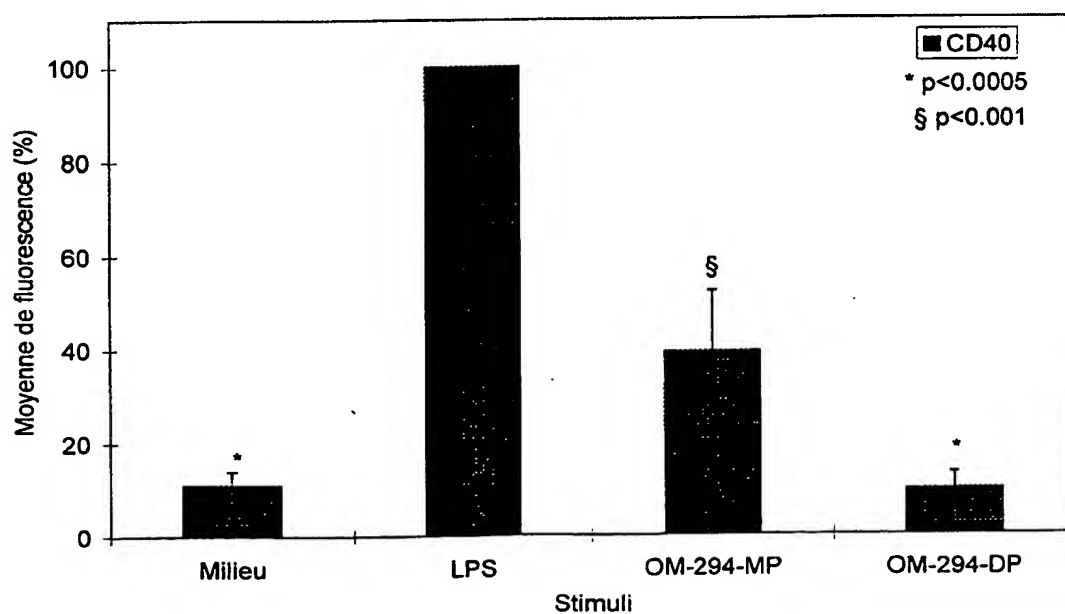
**FIGURE 3****Incorporation du Dextran-FITC****FIGURE 4****Incorporation du Dextran-FITC effet dose aux concentrations basses**

**FIGURE 5**

Incorporation du Dextran-FITC effet dose aux concentrations élevées

**FIGURE 6**

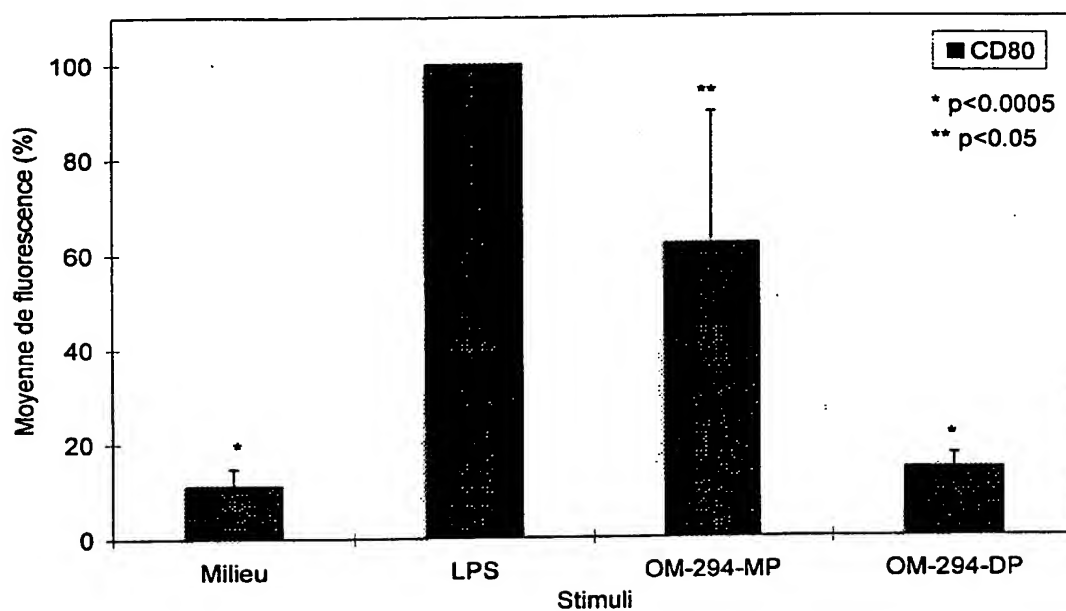
Expression de la molécule de surface costimulatrice CD40



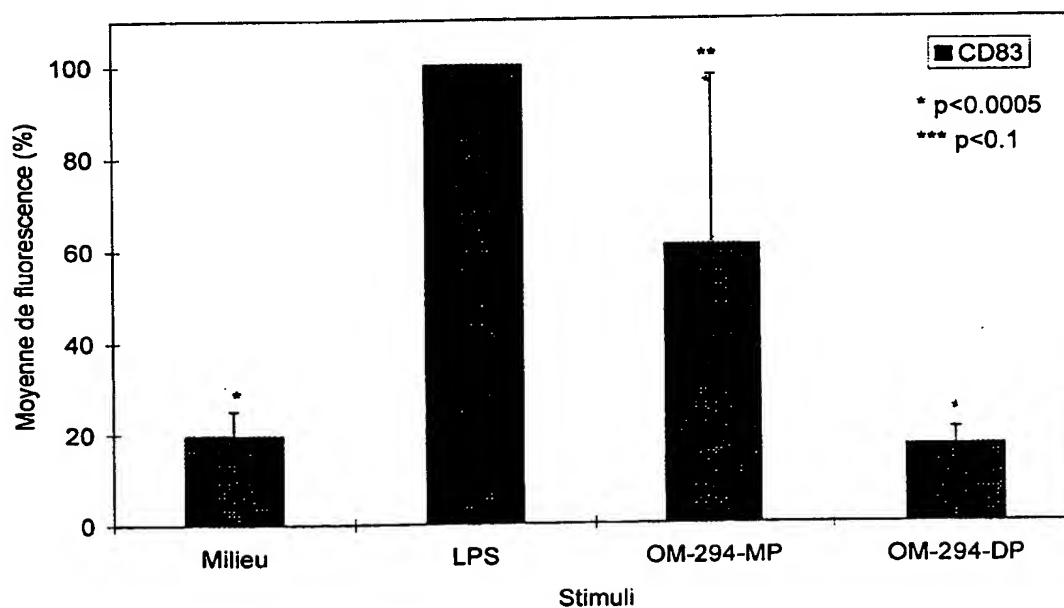


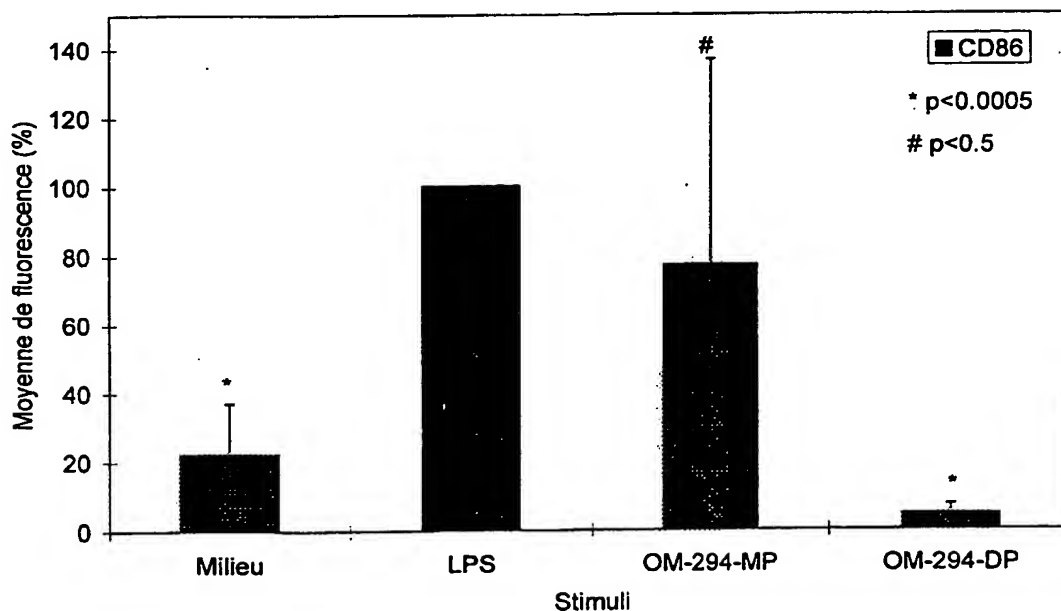
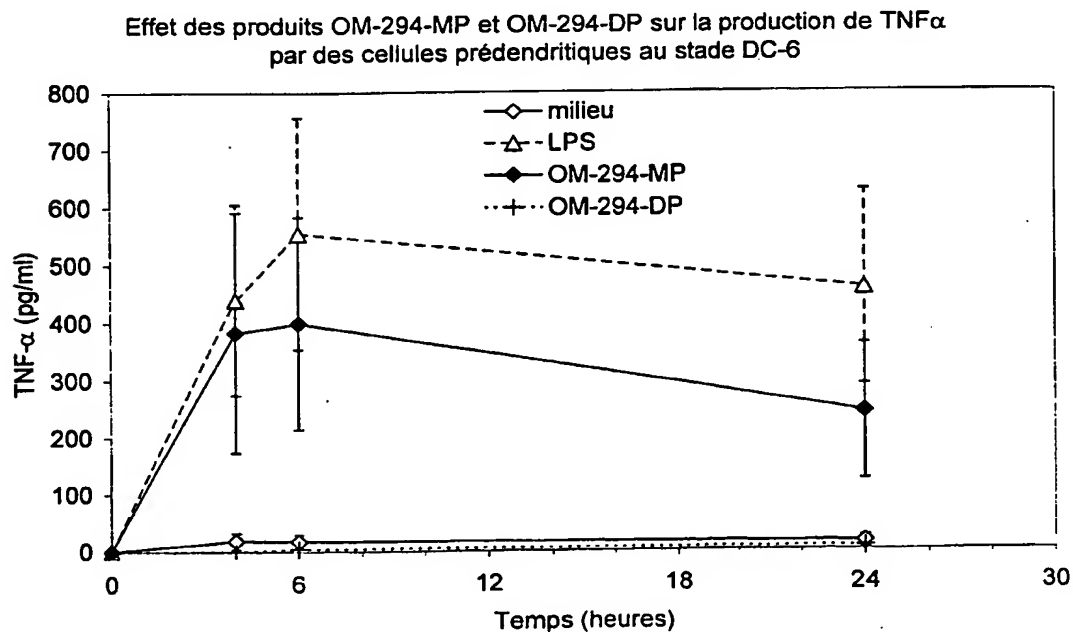
**FIGURE 7**

Expression de la molécule de surface costimulatrice CD80

**FIGURE 8**

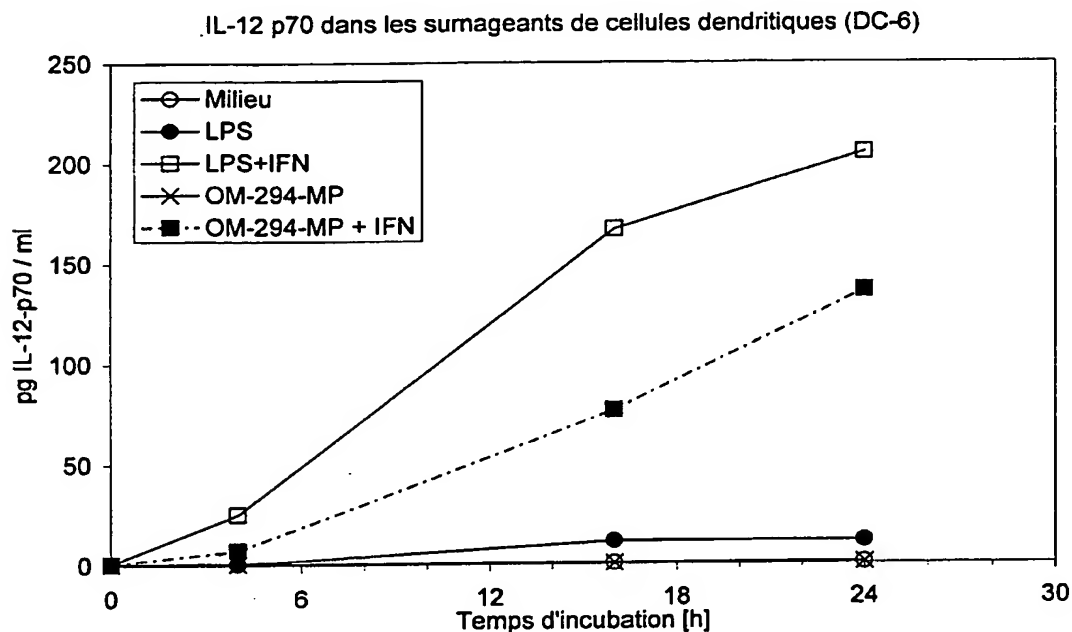
Expression de la molécule de surface costimulatrice CD83



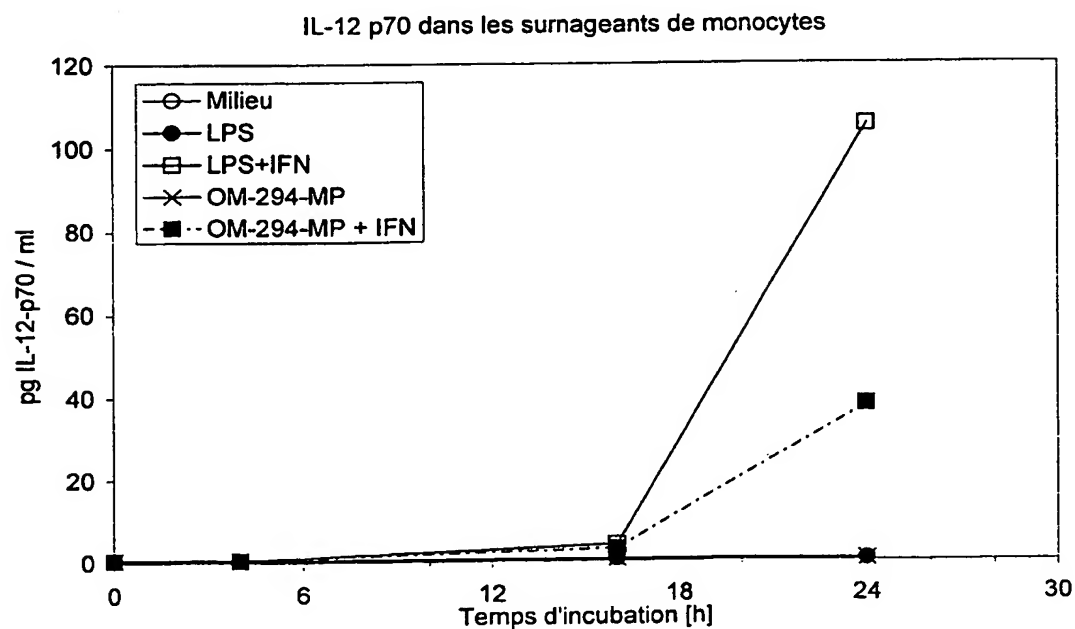
**FIGURE 9**Expression de la molécule de surface costimulatrice CD86**FIGURE 10**Effet des produits OM-294-MP et OM-294-DP sur la production de  $TNF\alpha$  par des cellules prédendritiques au stade DC-6

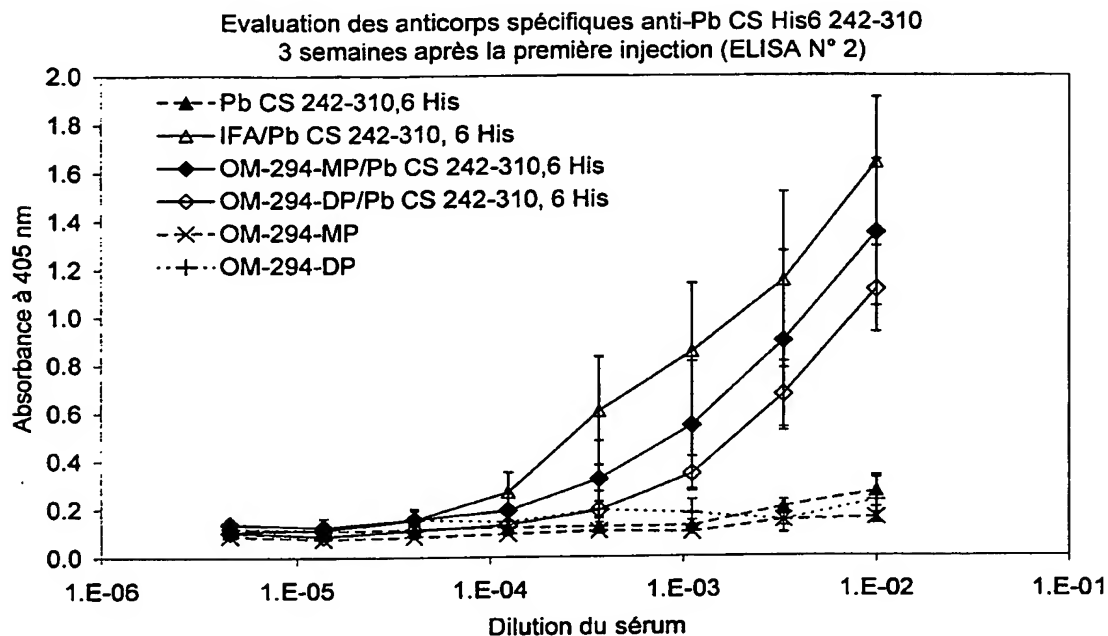
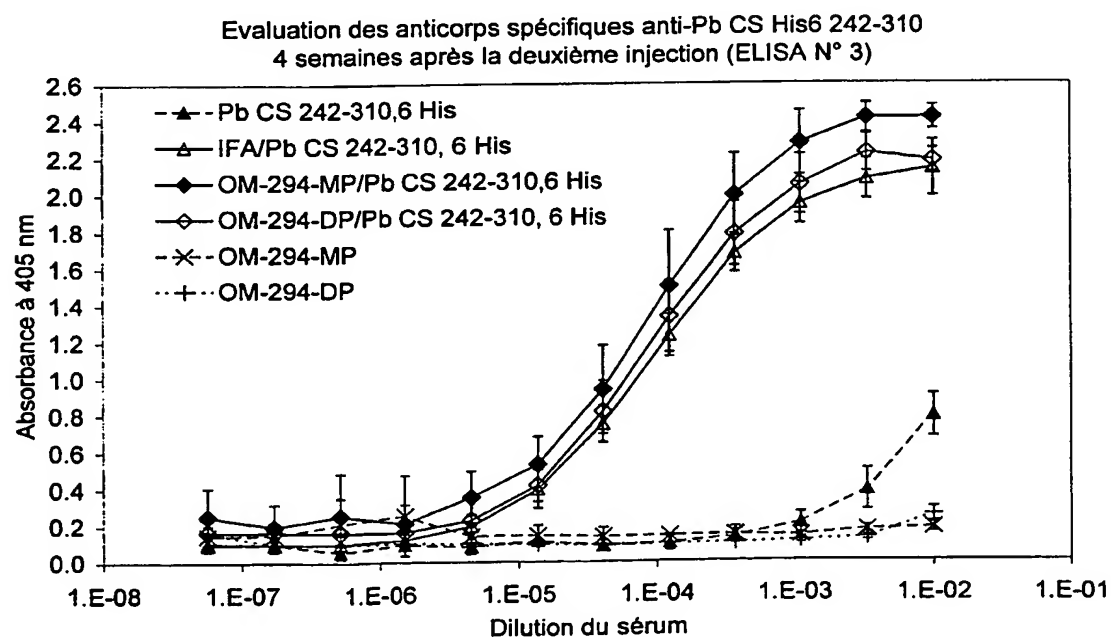
**FIGURE 11**

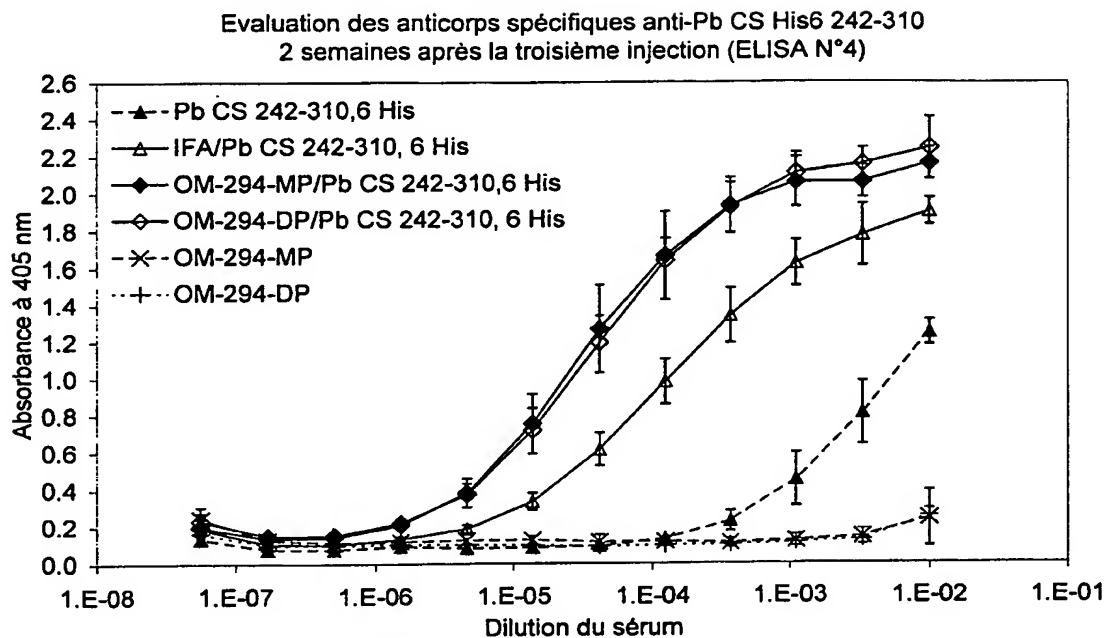
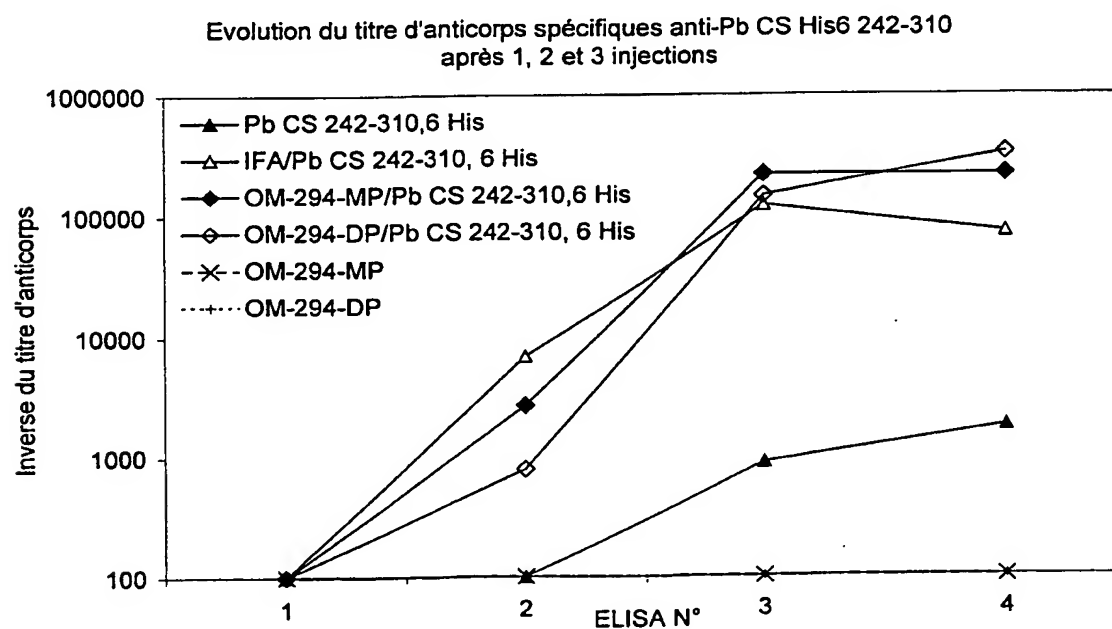
Effet des produits OM-294-MP sur la production de IL-12 p70 par des cellules prédendritiques au stade DC-6 (IFN = IFN- $\gamma$ )

**FIGURE 12**

Effet des produits OM-294-MP sur la production de IL-12 p70 par des monocytes (IFN = IFN- $\gamma$ )

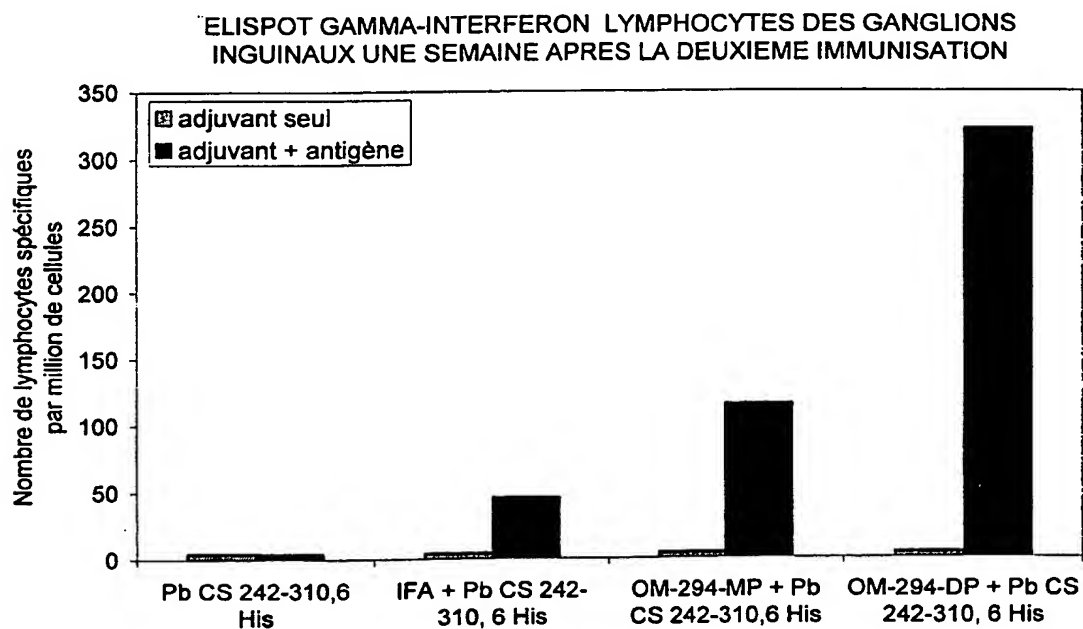


**FIGURE 13****ELISA 2 après la première immunisation****FIGURE 14****ELISA 3 après la deuxième immunisation**

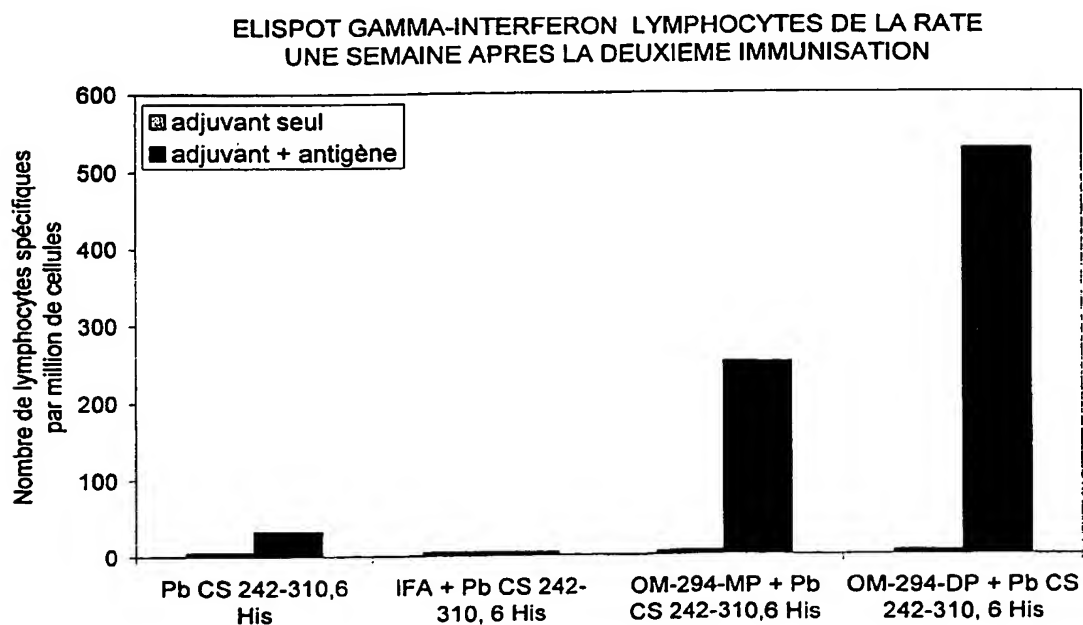
**FIGURE 15****ELISA 4 après la troisième immunisation****FIGURE 16****Titre d'anticorps avant et après une, deux et trois immunisations**

**FIGURE 17**

ELISPOT IFN- $\gamma$  lymphocytes des ganglions inguinaux stimulés avec Pb CS 245-252  
une semaine après la deuxième immunisation

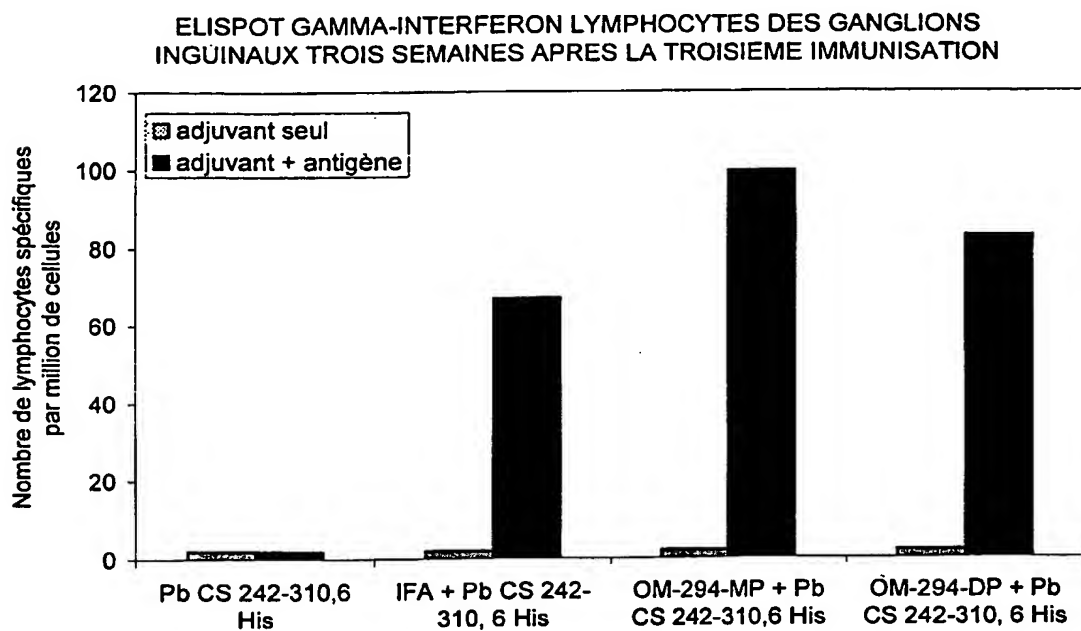
**FIGURE 18**

ELISPOT IFN- $\gamma$  lymphocytes de la rate stimulés avec Pb CS 245-252 une semaine  
après la deuxième immunisation

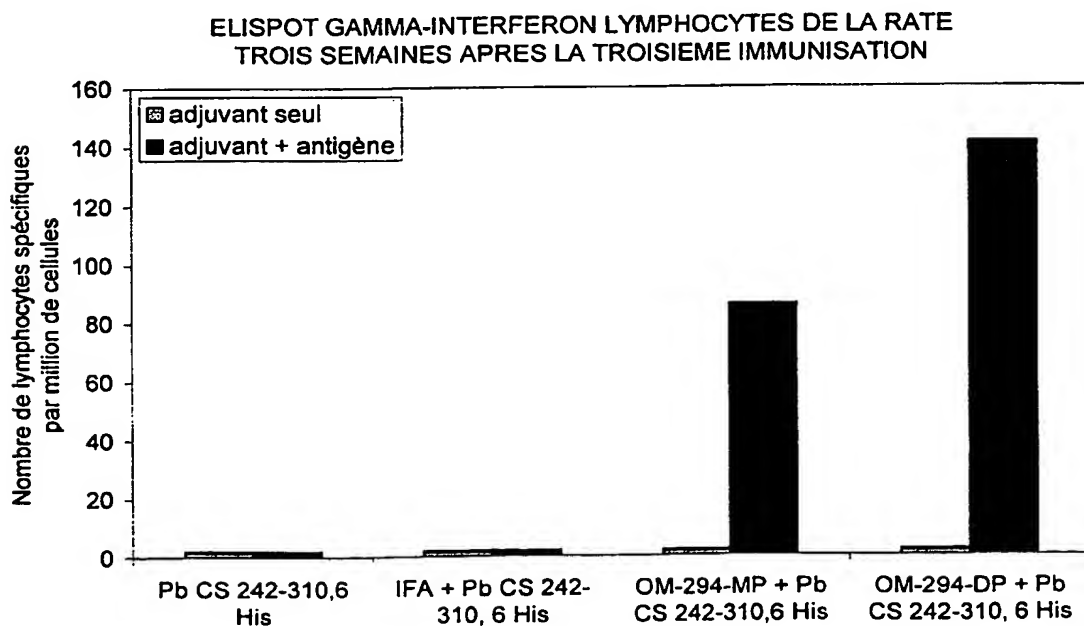


**FIGURE 19**

ELISPOT IFN- $\gamma$  lymphocytes des ganglions inguinaux stimulés avec Pb CS 245-252  
trois semaines après la troisième immunisation

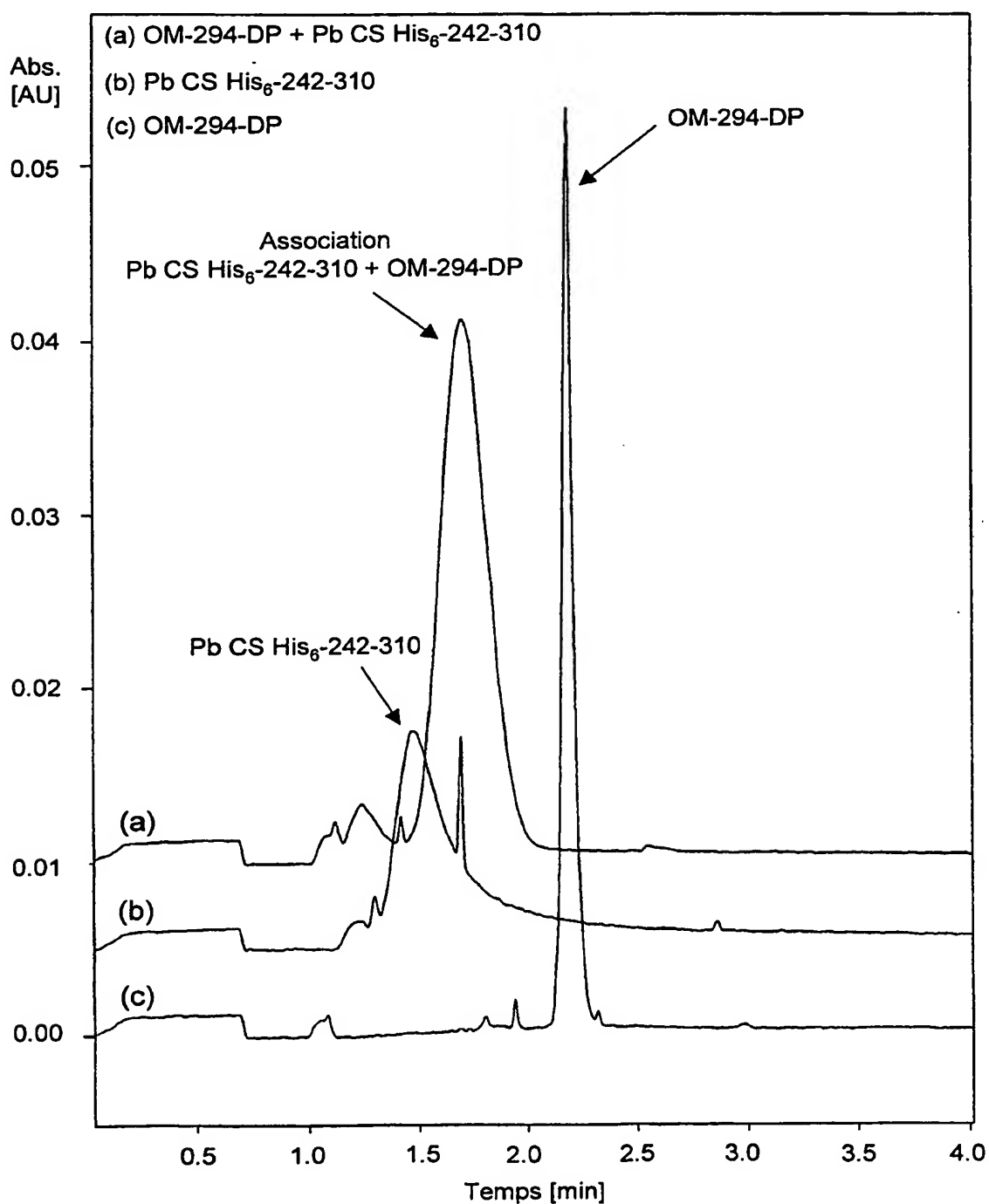
**FIGURE 20**

ELISPOT IFN- $\gamma$  lymphocytes de la rate stimulés avec Pb CS 245-252 trois semaines  
après la troisième immunisation



**FIGURE 21**

Electrophérogrammes de l'OM-294-DP seul, de l'antigène Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 seul et de l'association Pb CS His<sub>6</sub>-242-310 – OM-294-DP





12/32

FIGURE 22

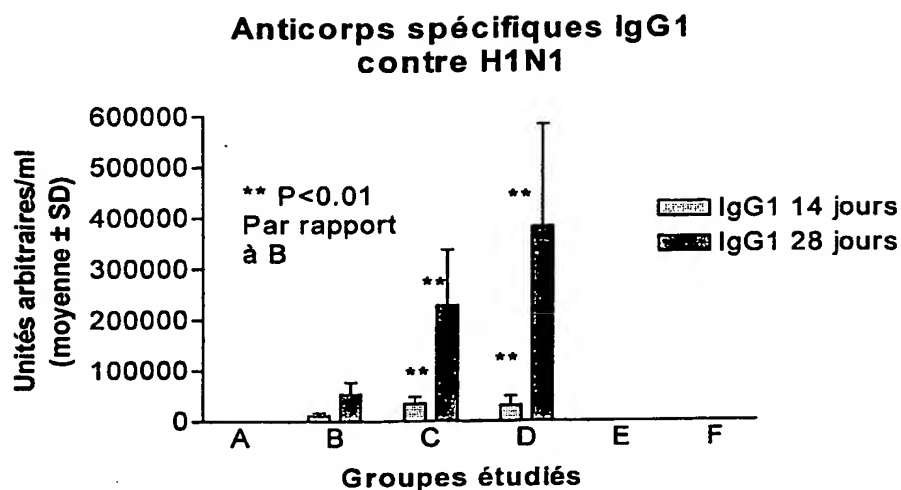


FIGURE 23

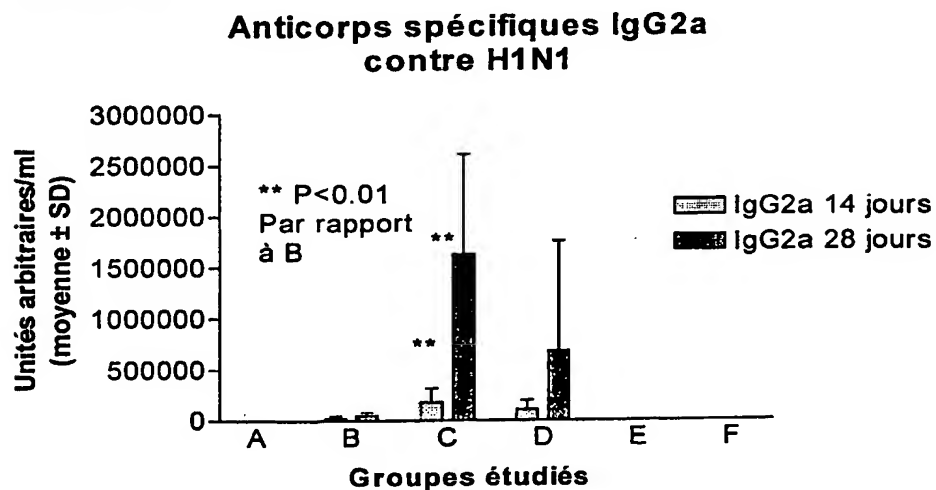


FIGURE 24

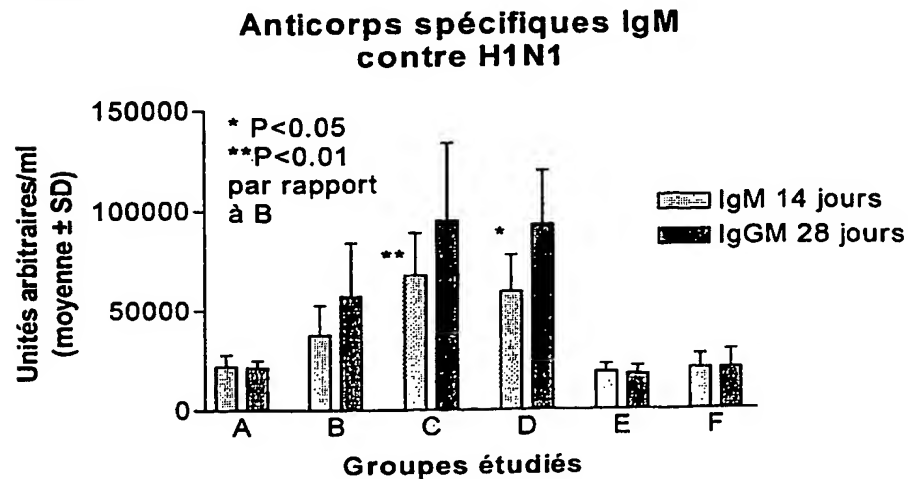


FIGURE 25

### Anticorps spécifiques IgG1 contre l'ovalbumine

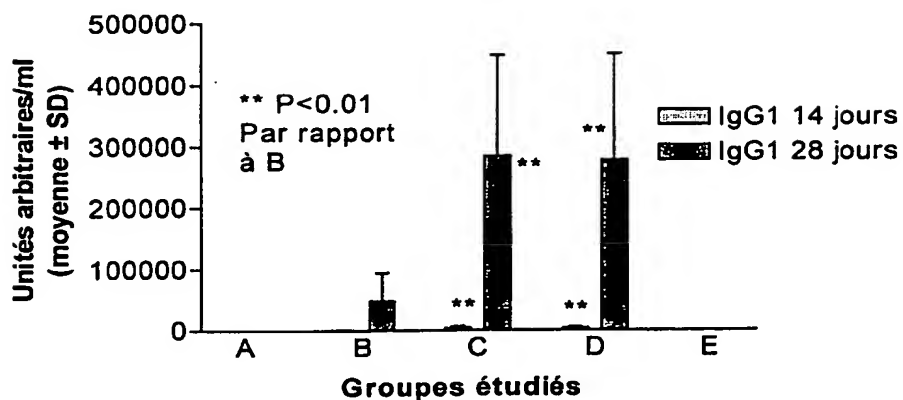


FIGURE 26

### Anticorps spécifiques IgG2a contre l'ovalbumine

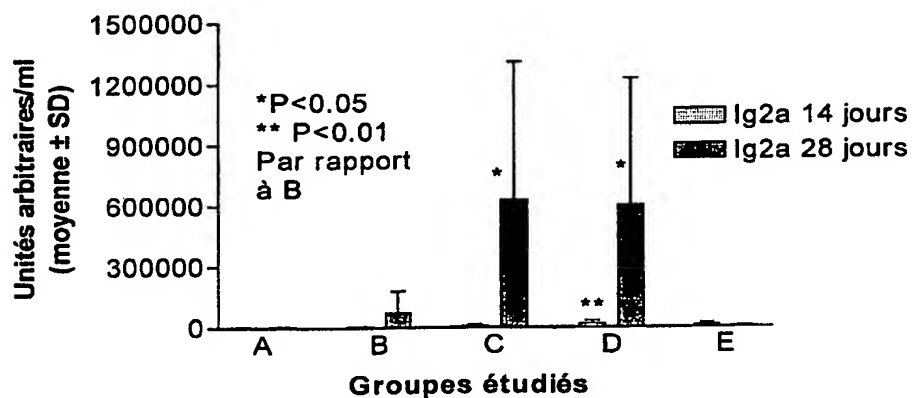


FIGURE 27

### Anticorps spécifiques IgM contre l'ovalbumine

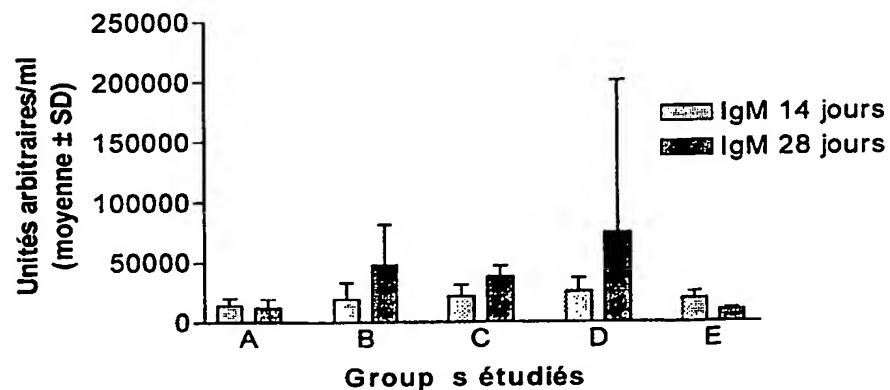


FIGURE 28

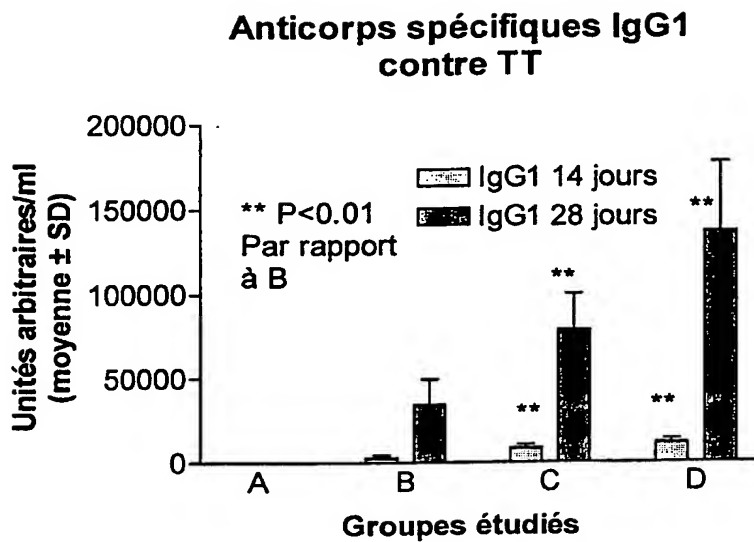


FIGURE 29

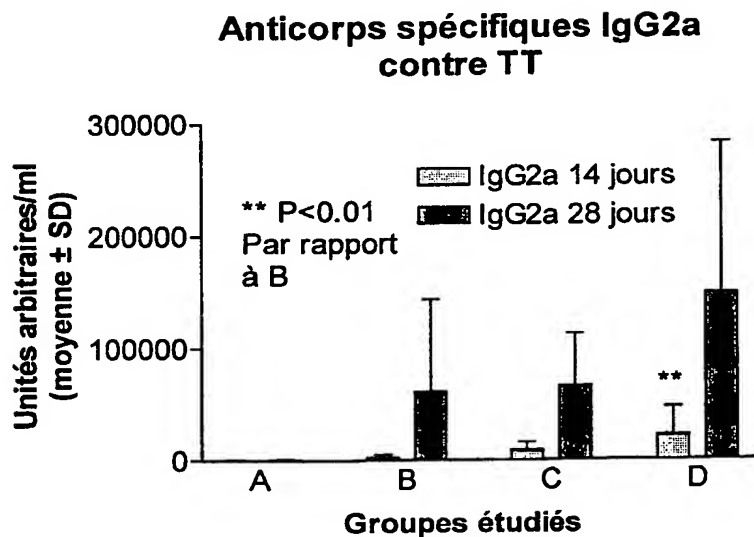


FIGURE 30 (a)

**AUGMENTATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE  
ANTI-GP63 PAR L'ADJUVANT OM-294-MP :  
COMPARAISON AVEC LE BCG.**

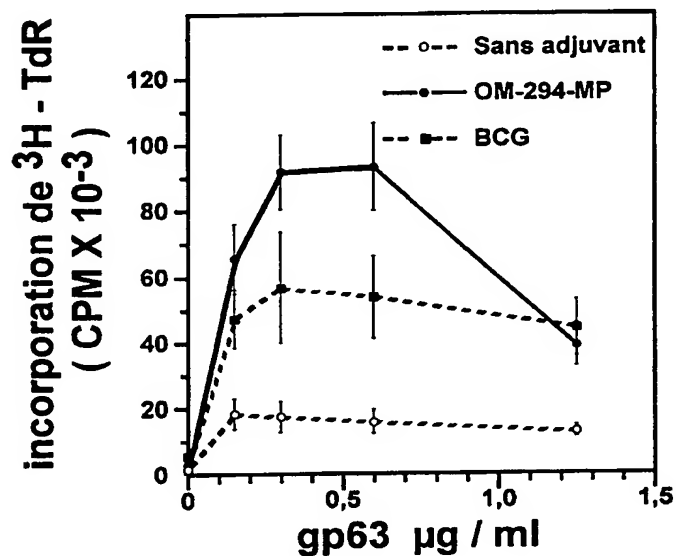


FIGURE 30 (b)

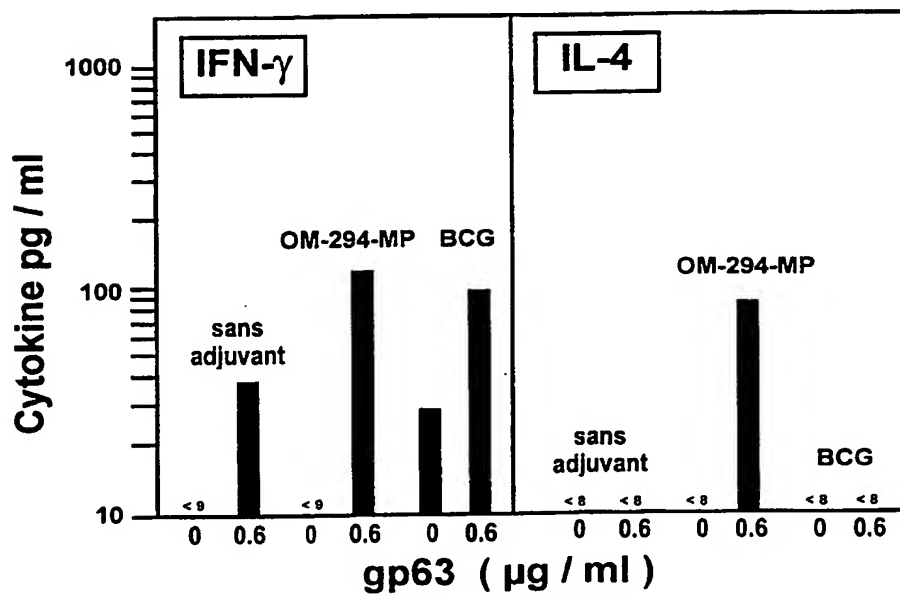


FIGURE 31 (a)

**REPONSE IN VITRO DE LYMPHOCYTES  
GANGLIONNAIRES PROVENANT DE SOURIS  
IMMUNISEES IN VIVO AVEC L'ANTIGENE LmCPb :  
EFFET DE L'ADJUVANT OM-294-MP AU COURS  
DE LA REPONSE PRIMAIRE**

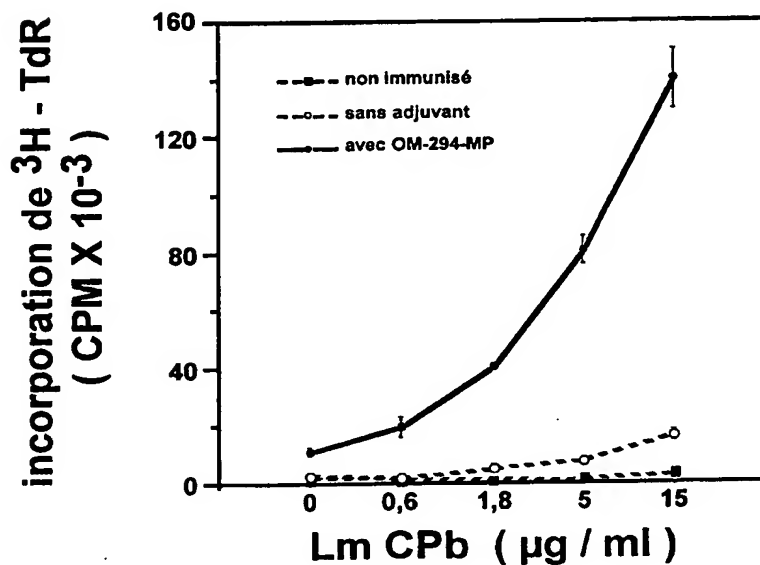


FIGURE 31 (b)

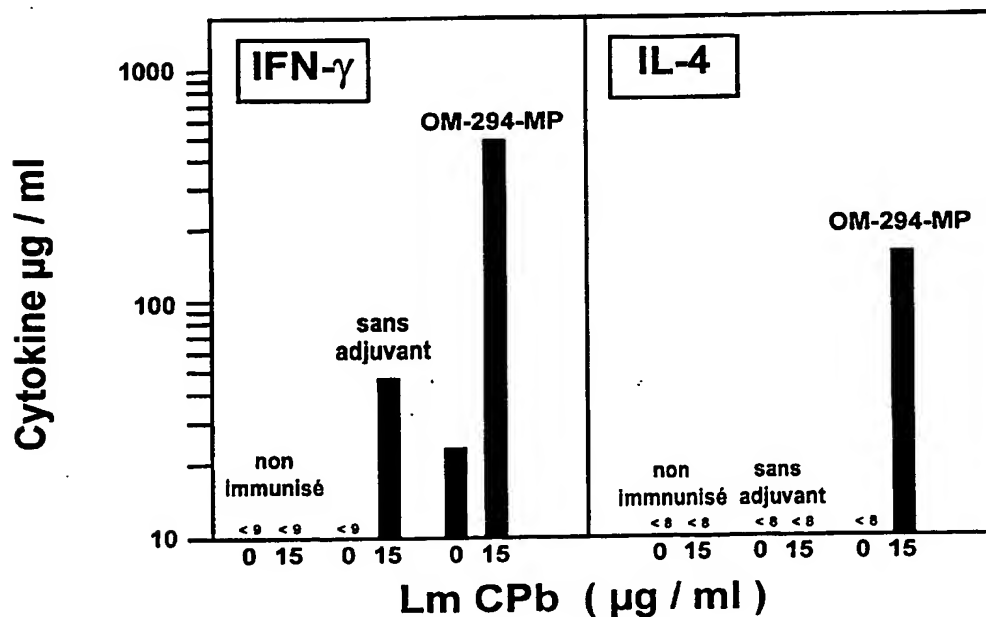


FIGURE 32 (a)

**AUGMENTATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE  
ANTI-LmCPb PAR L'ADJUVANT OM-294-MP :  
COMPARAISON AVEC LE BCG.**

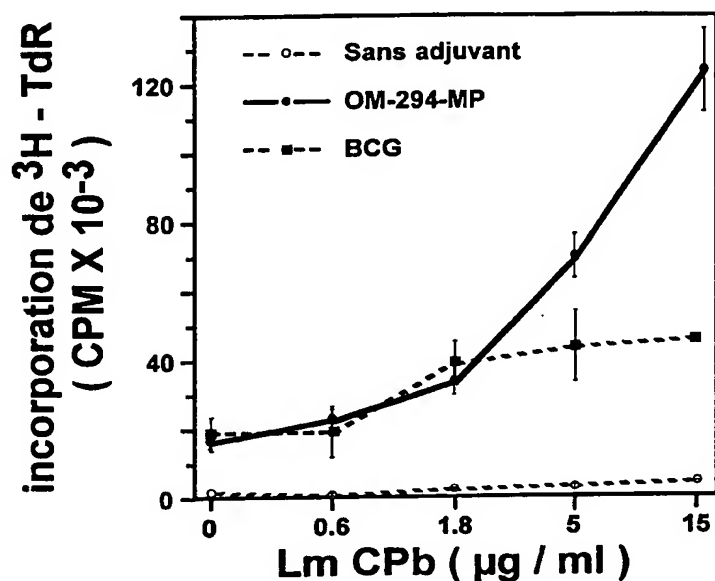
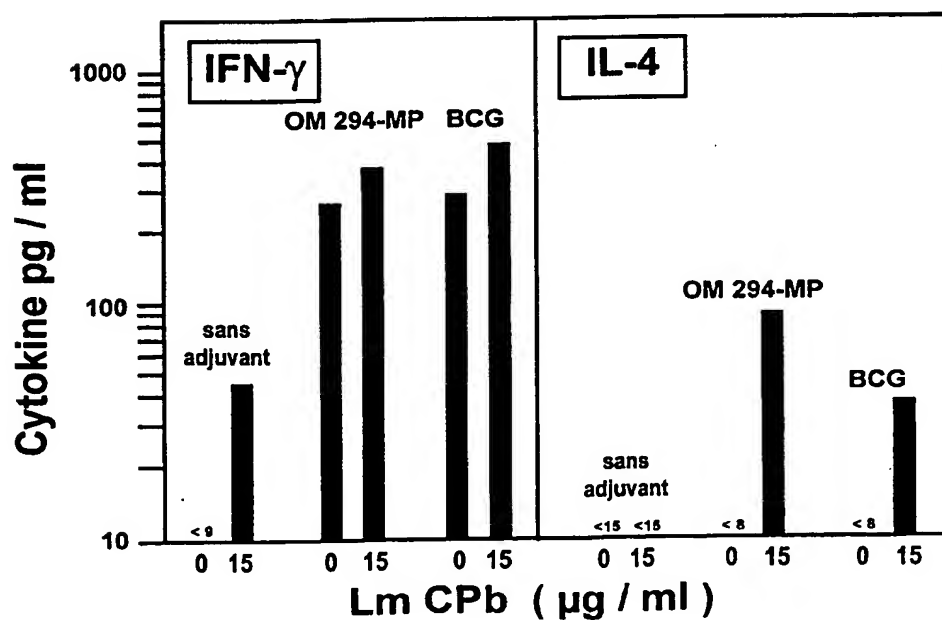
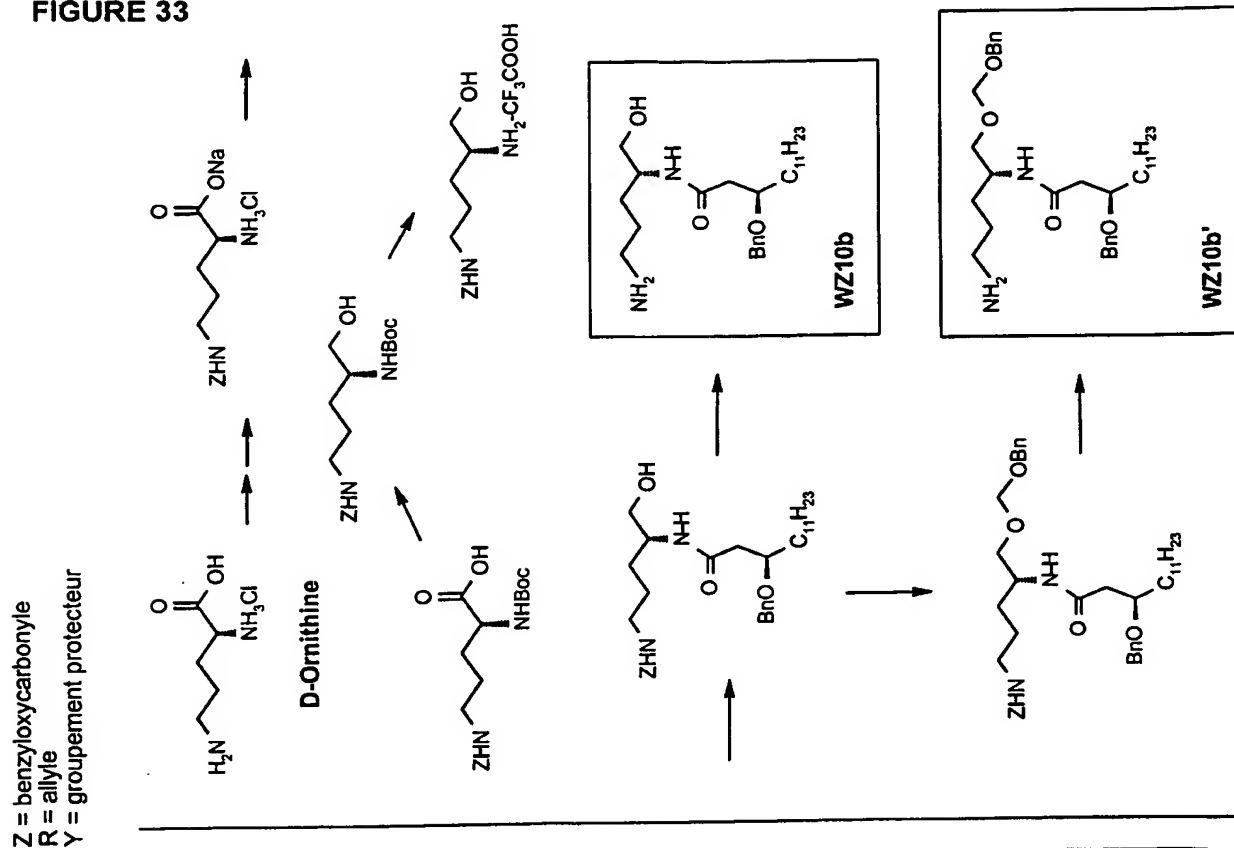


FIGURE 32 (b)



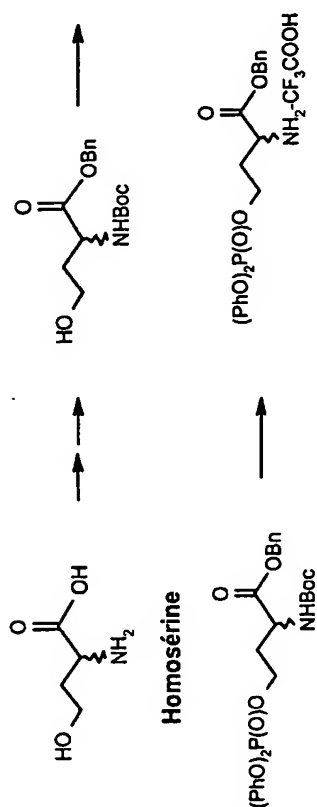
18/32

FIGURE 33

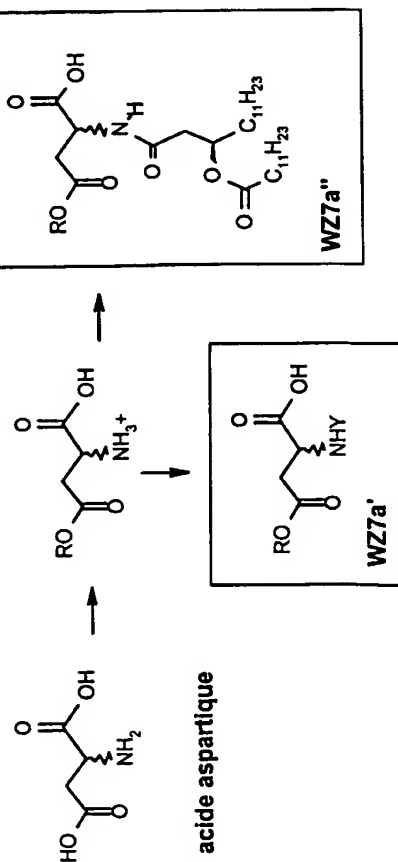


## SCHEMA DE SYNTHESE 1

## Voi homosérine



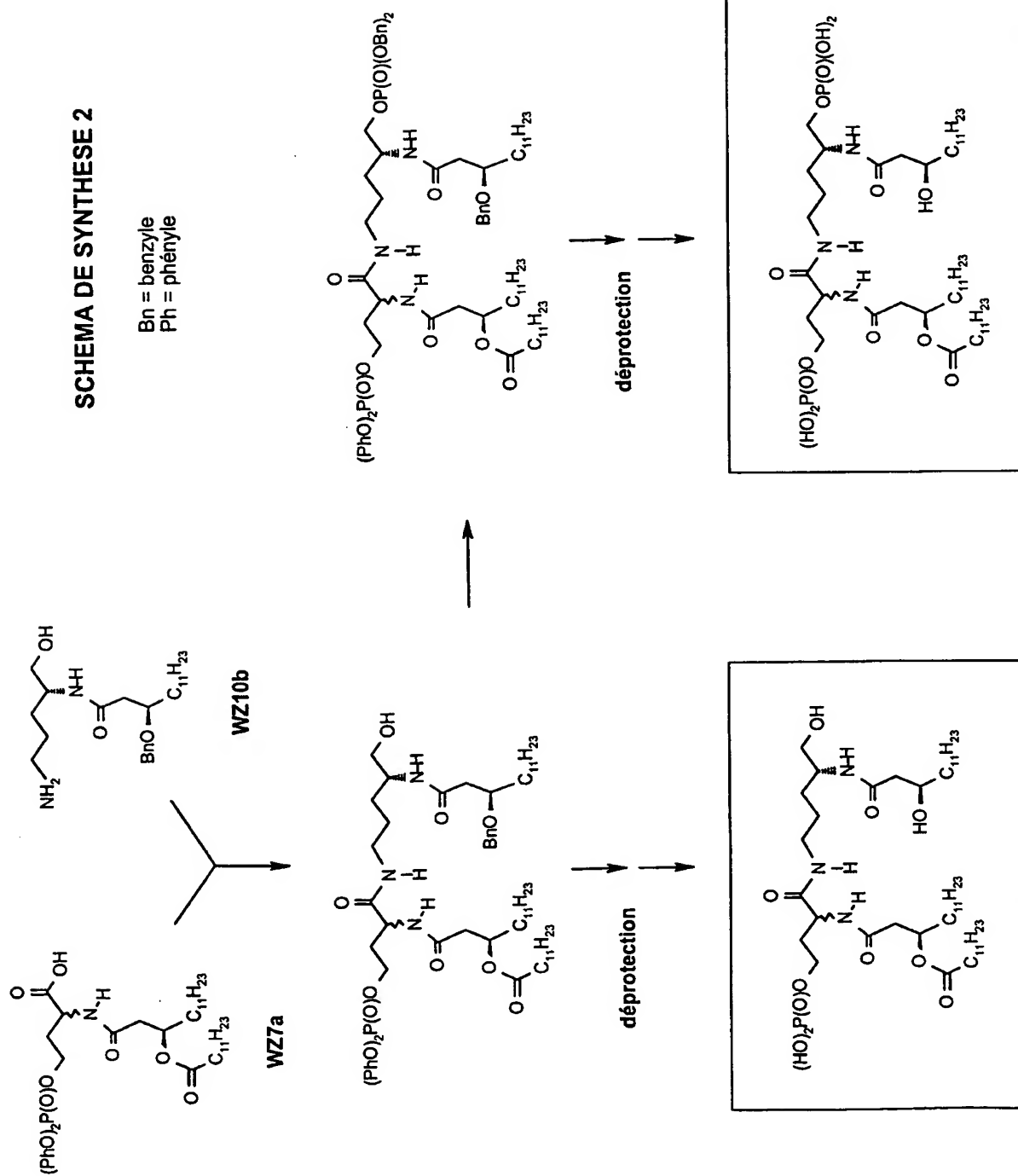
## Voie acide aspartique



**FIGURE 34**

## SCHEMA DE SYNTHÈSE 2

**Bn = benzyle**  
**Ph = phényle**





**FIGURE 35**

### SCHEMA DE SYNTHÈSE 3

**Bn = benzyle**  
**Ph = phényle**

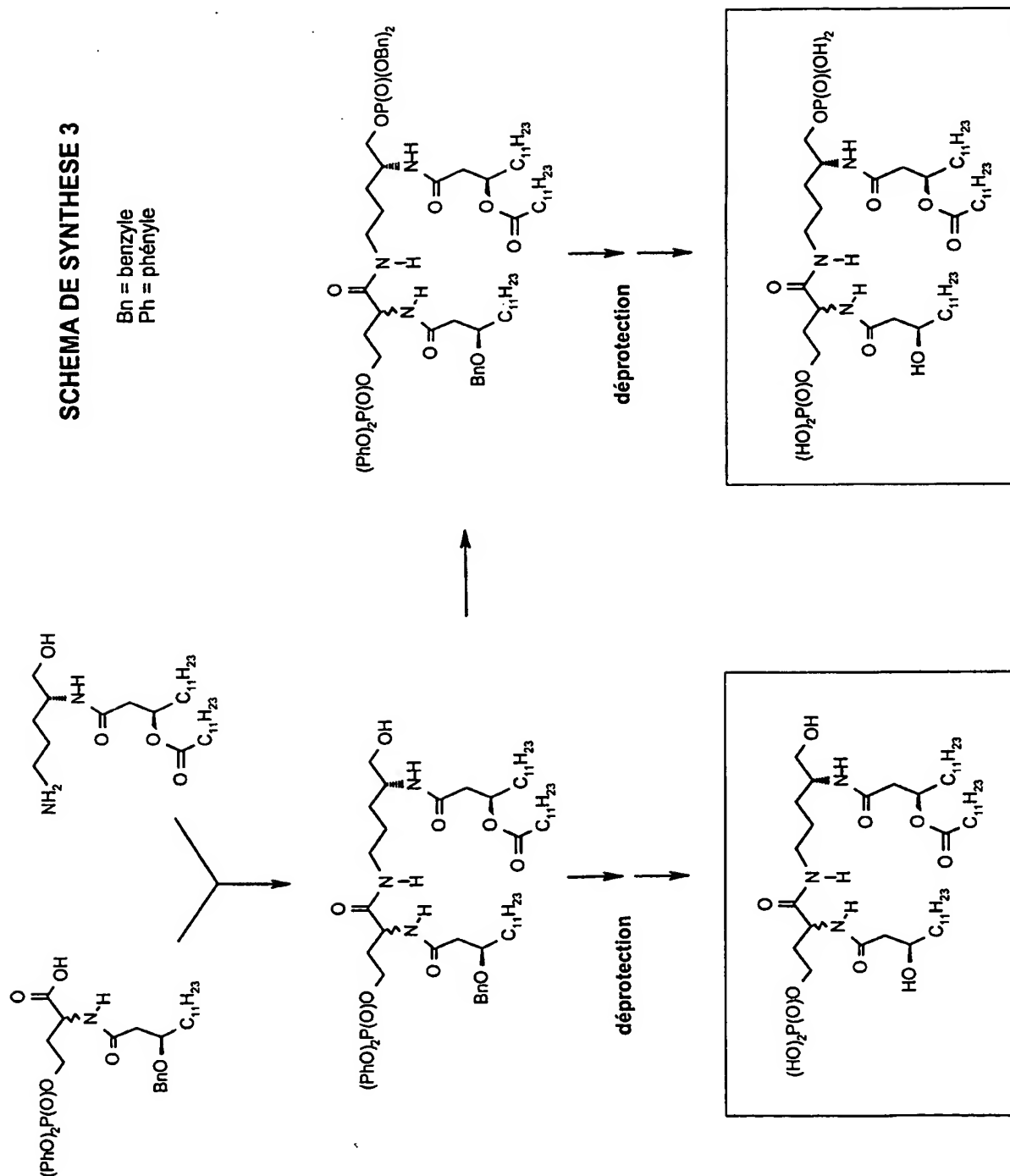


FIGURE 36

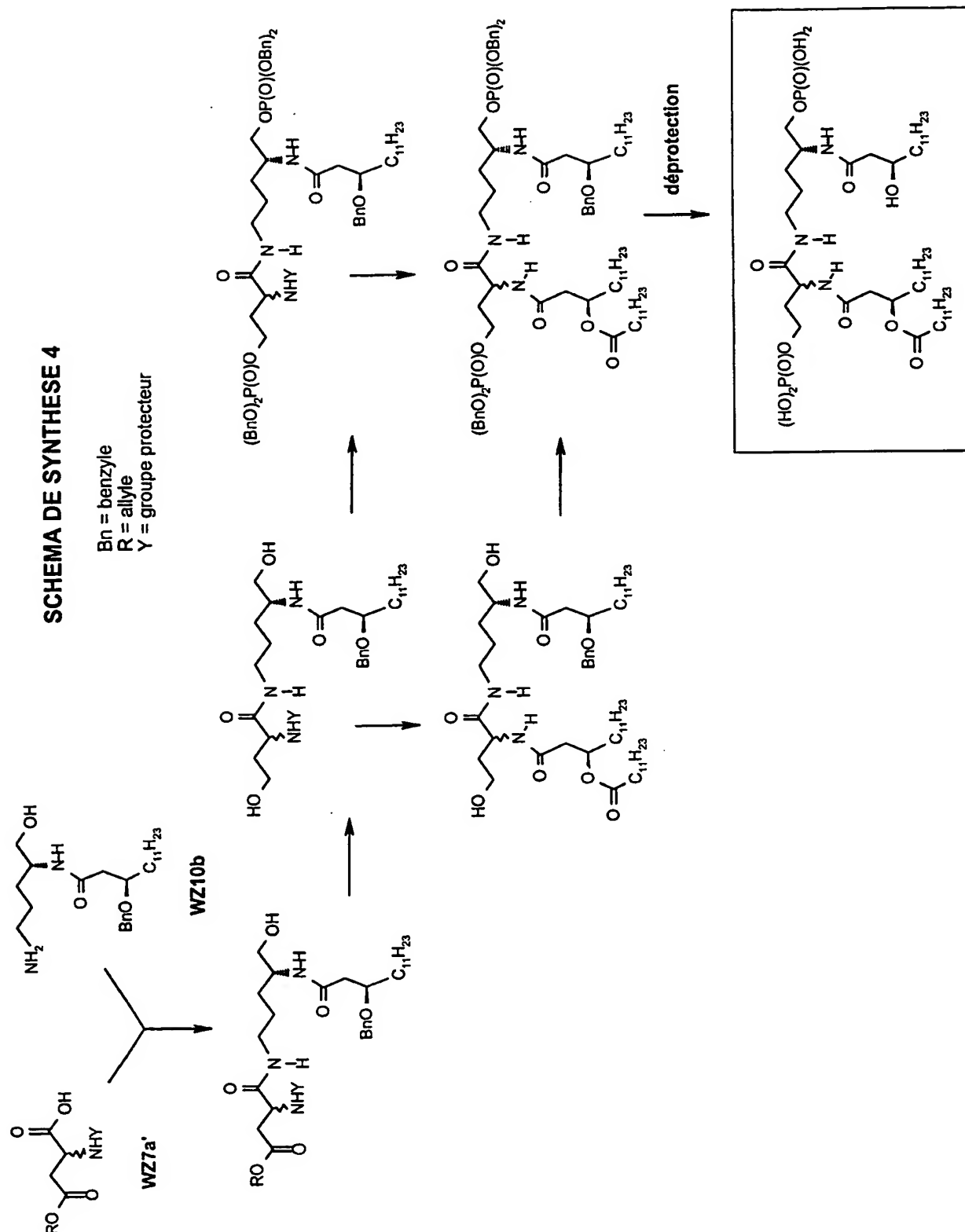
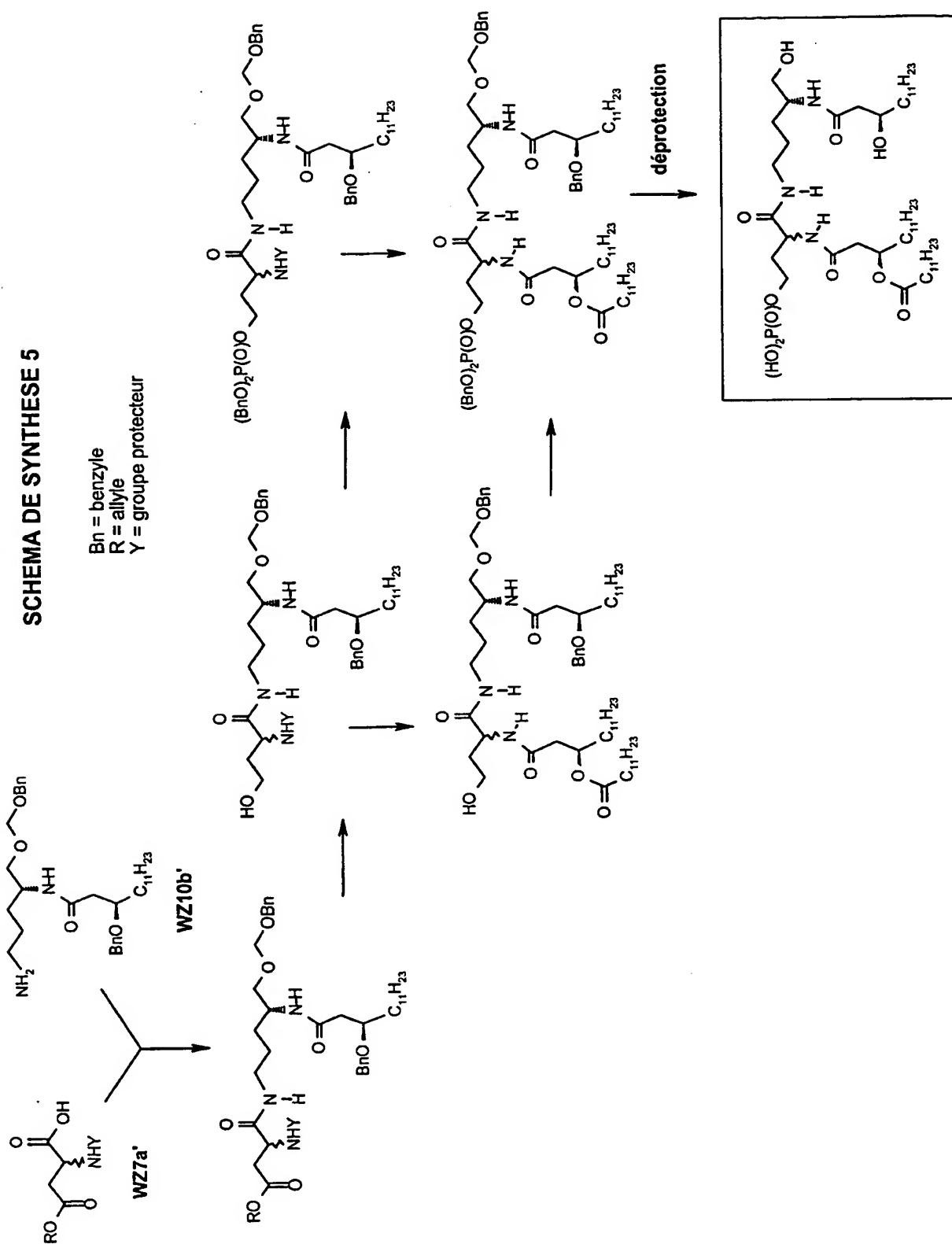


FIGURE 37



23/32

FIGURE 38

## SCHEMA DE SYNTHESE 6

Bn = benzyle  
R = Allyle

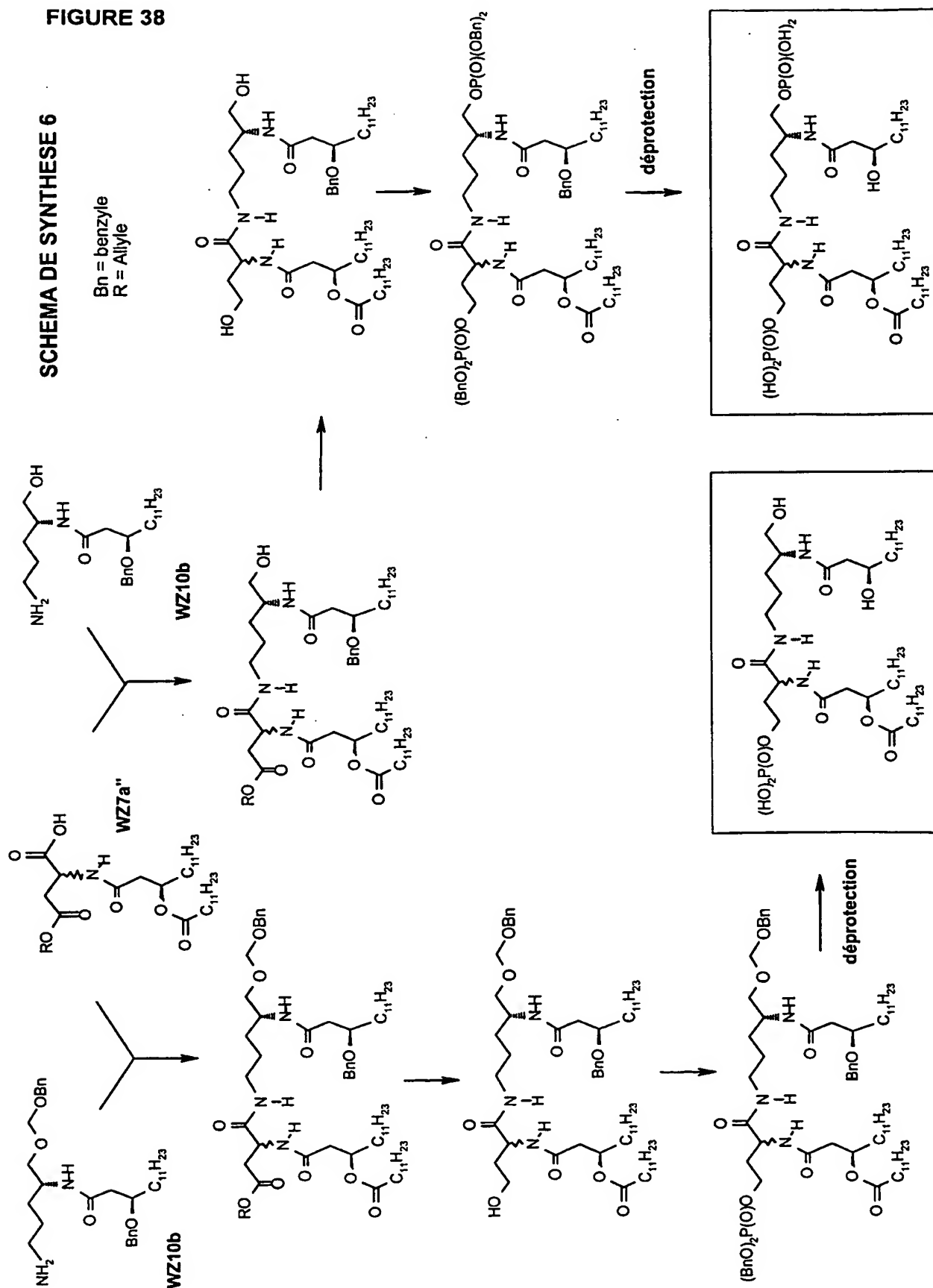
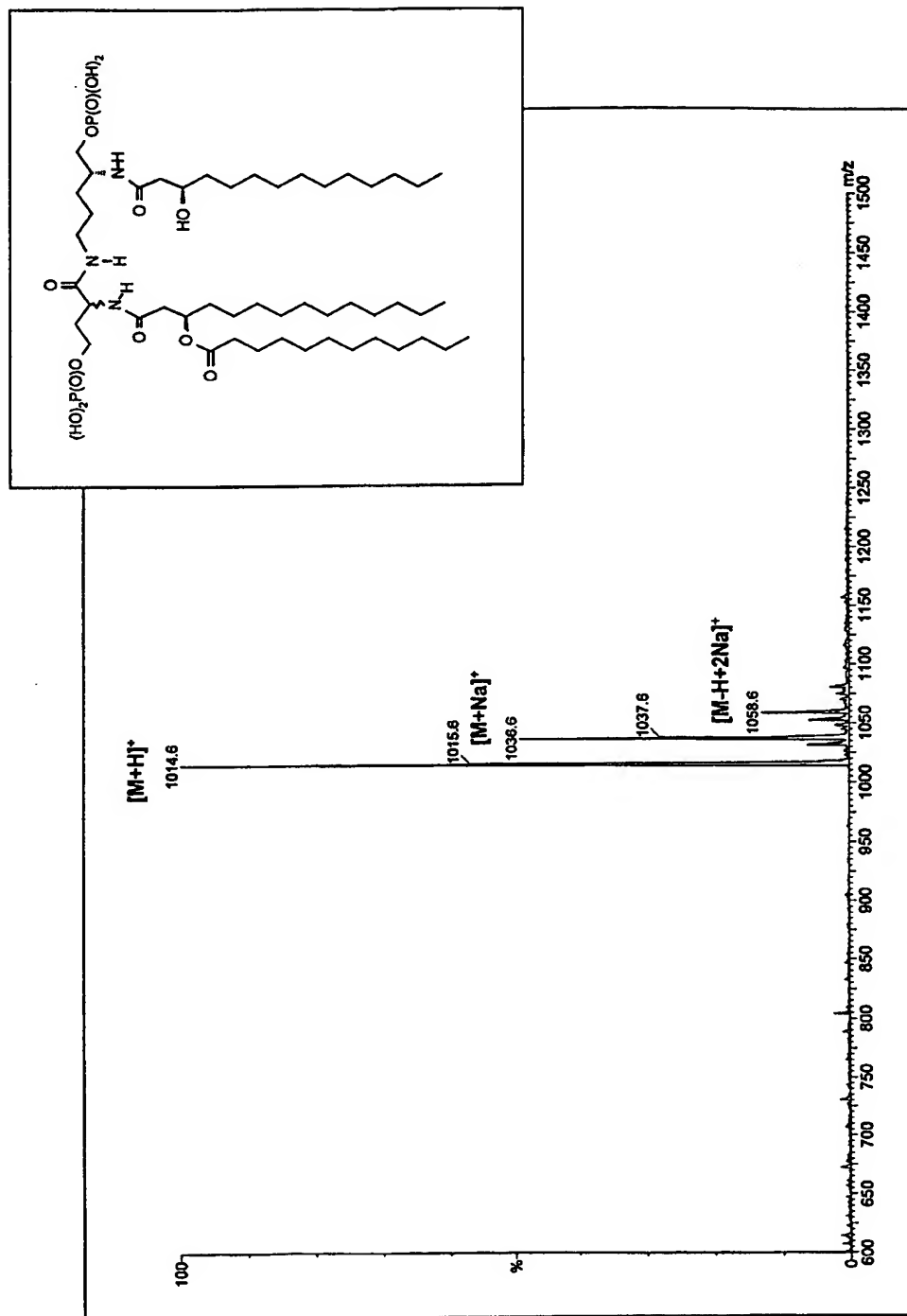


FIGURE 39

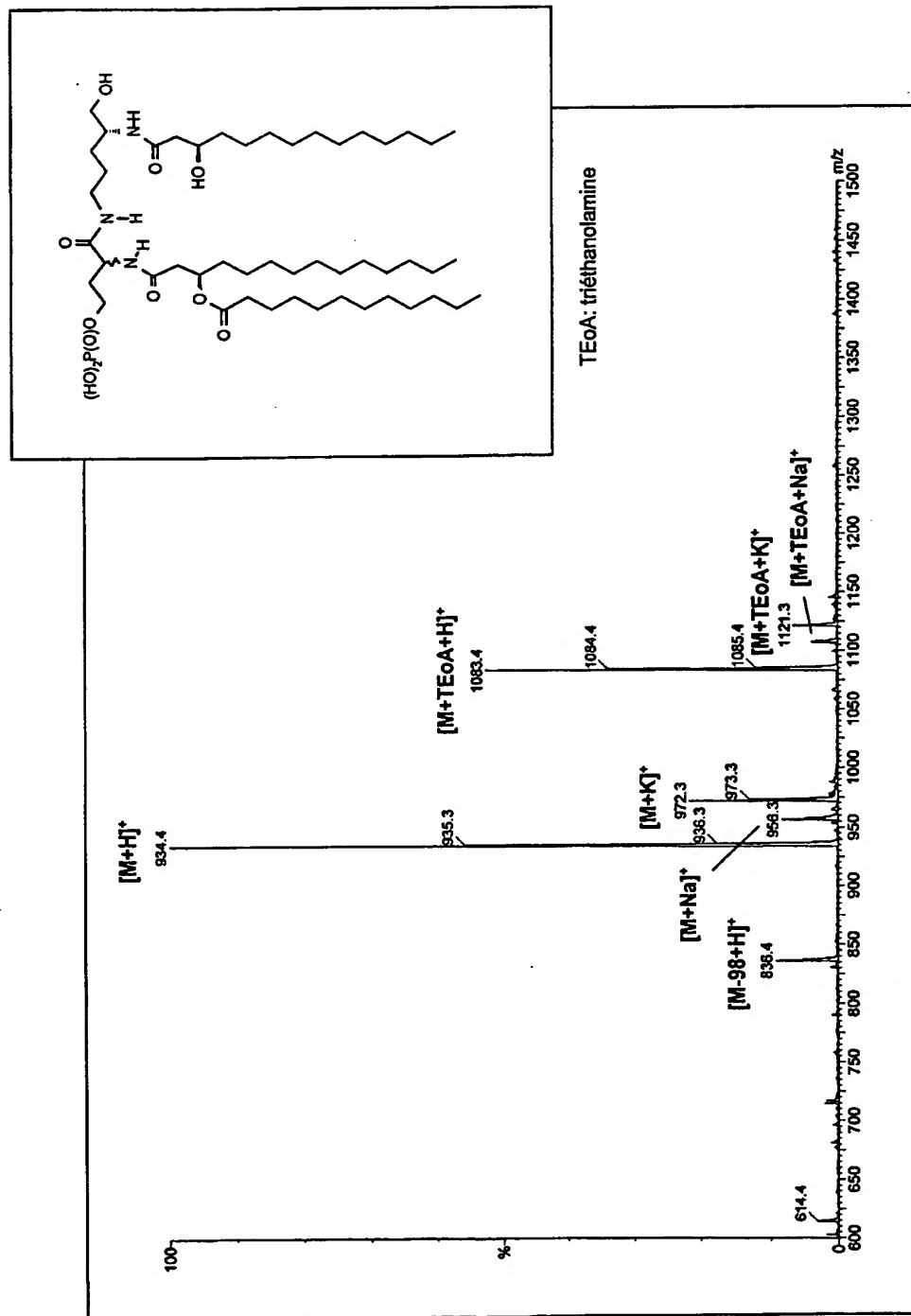
**SPECTRE 1**  
**Composé diphosphorylé**  
**Spectres ES-MS (mode positif)**



Instrumentation: Micromass Quattro II (Z-spray), triple stage quadrupole

FIGURE 40

**SPECTRE 2**  
**Composé monophosphorylé**  
**Spectres ES-MS (mode positif)**



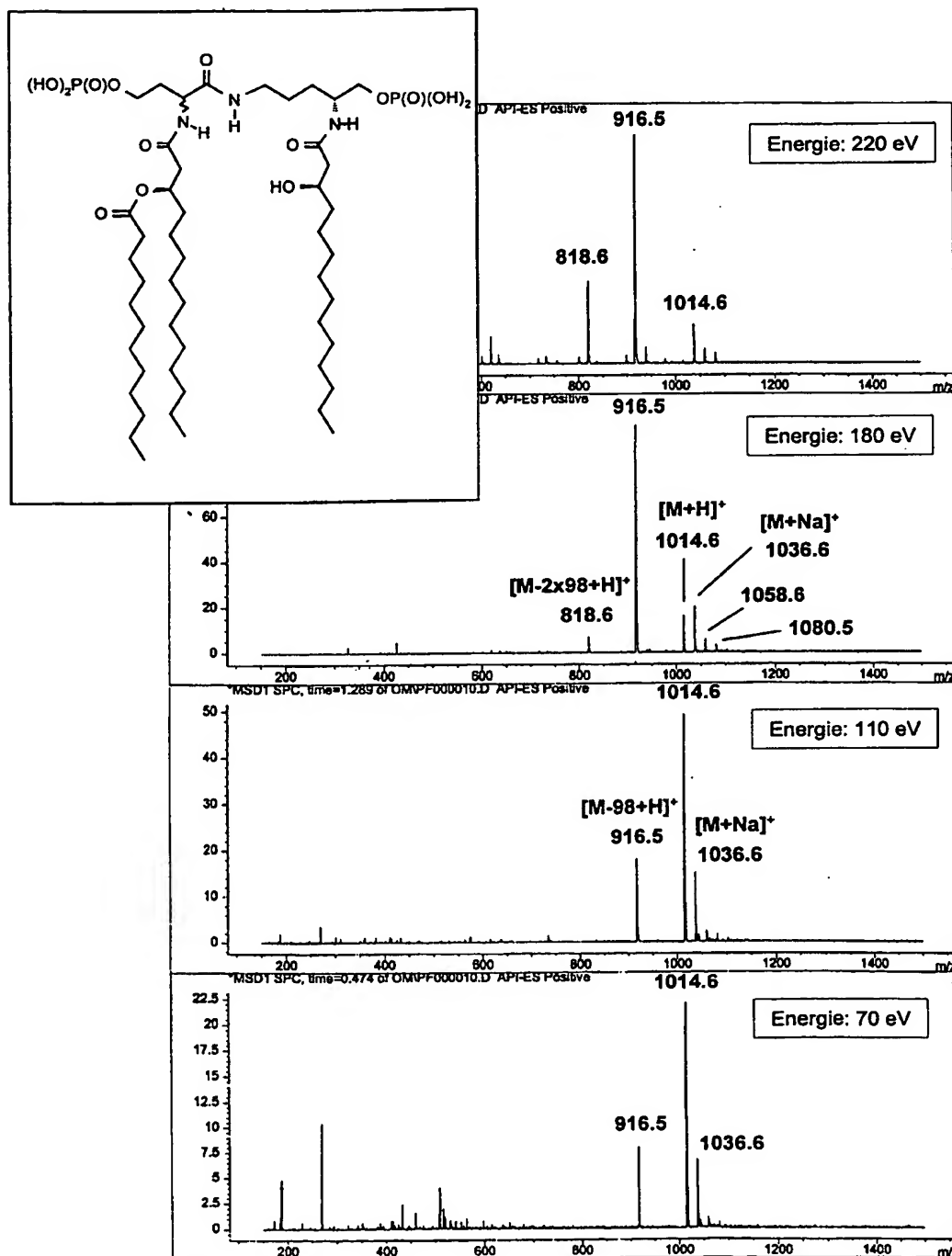
Instrumentation: Micromass Quatro II (Z-spray), triple stage quadrupole

FIGURE 41

## SPECTRE 3

## Composé diphosphorylé

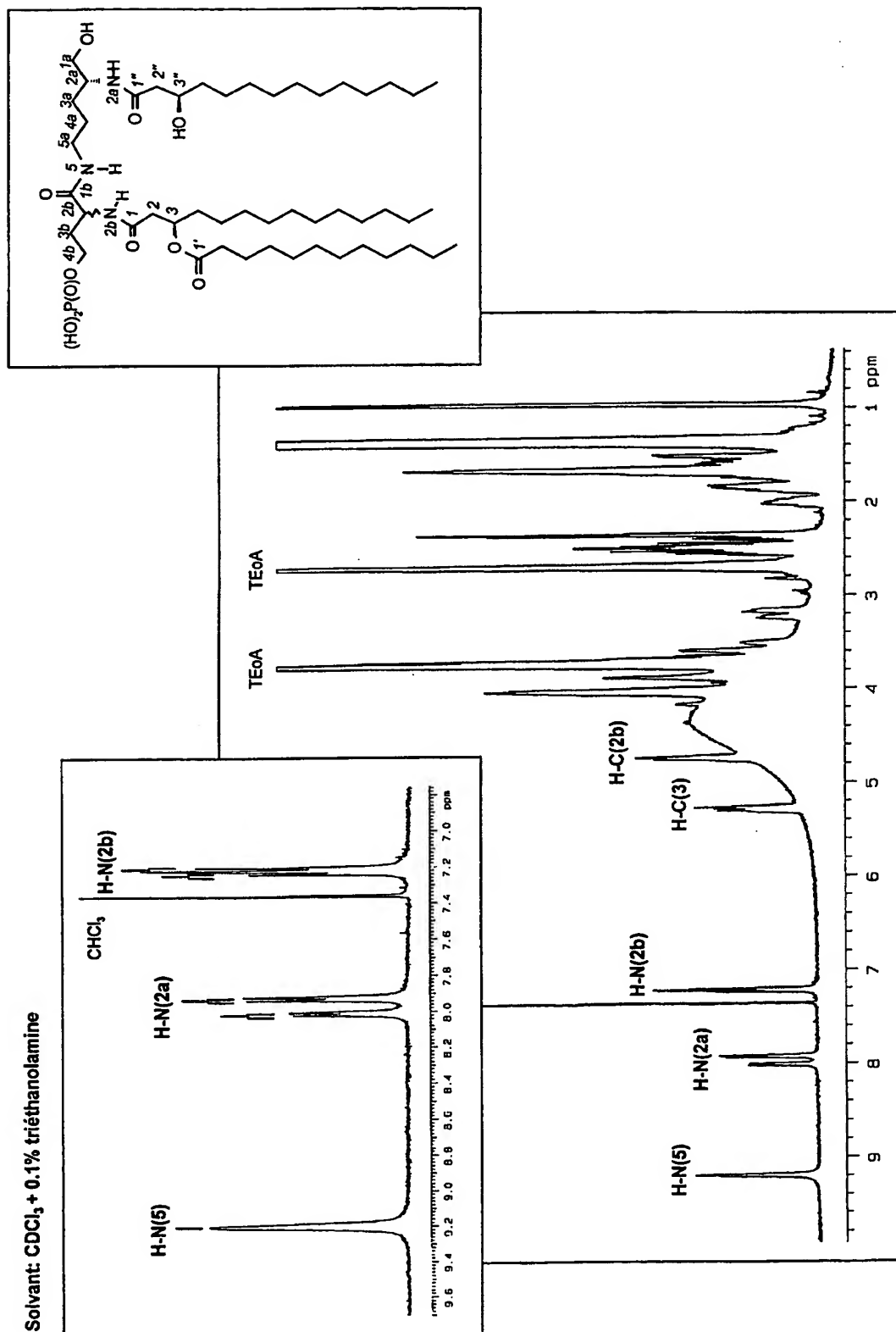
## Spectres ES-MS (fragmentation en mode positif)



Instrumentation: Hewlett-Packard MSD, single quadrupol

FIGURE 42

**Composé monophosphorylé**  
**Spectre  $^1\text{H}$ -RMN**

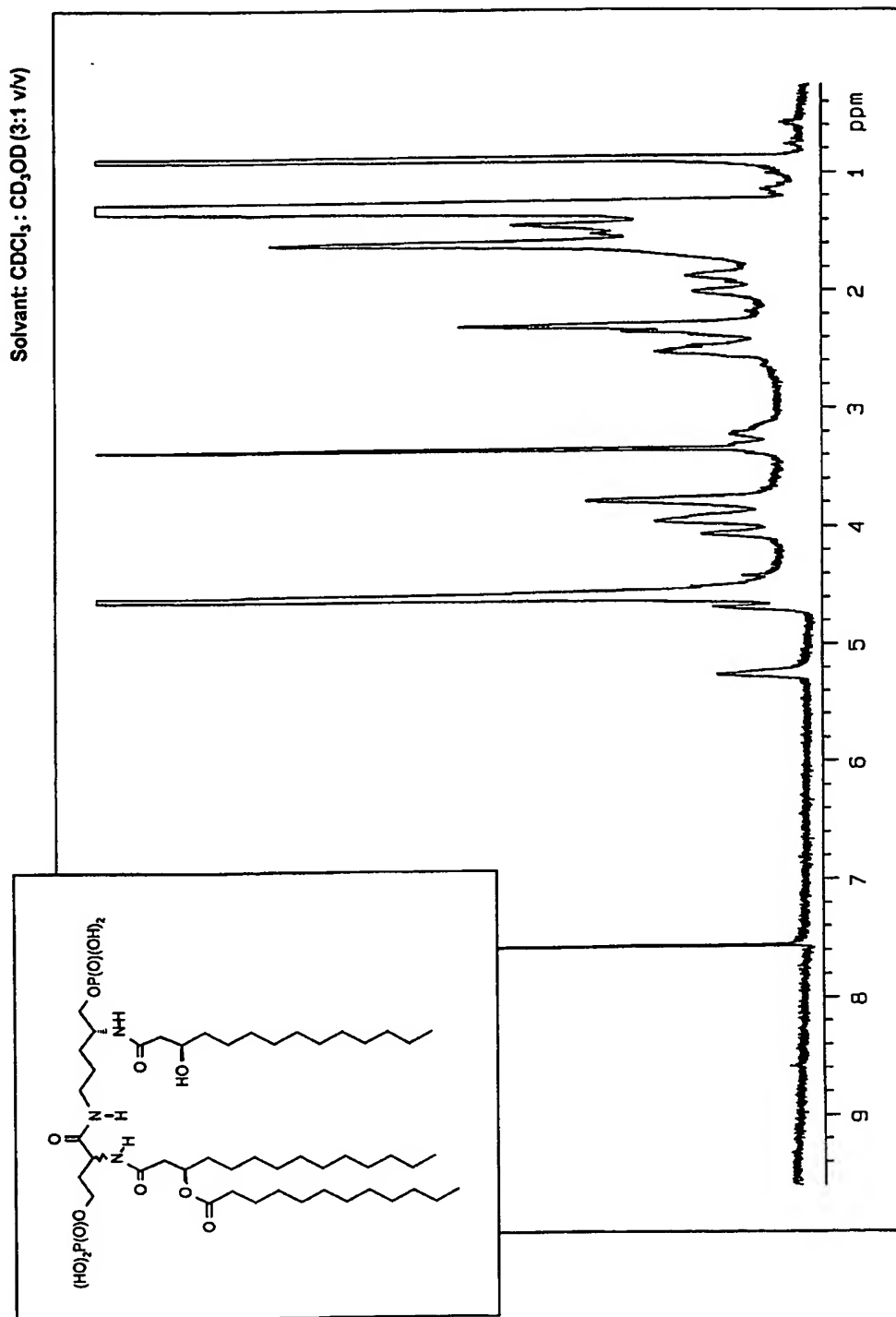
**SPECTRE 4**Solvant:  $\text{CDCl}_3$  + 0.1% triéthanolamine

Instrumentation: Varian Unity INOVA 500 MHz



FIGURE 43

**SPECTRE 5**  
**Composé diphosphorylé**  
**Spectre  $^1\text{H}$ -RMN**



Instrumentation: Varian Unity INOVA 500 MHz

FIGURE 44

**SPECTRE 6**  
**Composé monophosphorylé**  
**Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN**

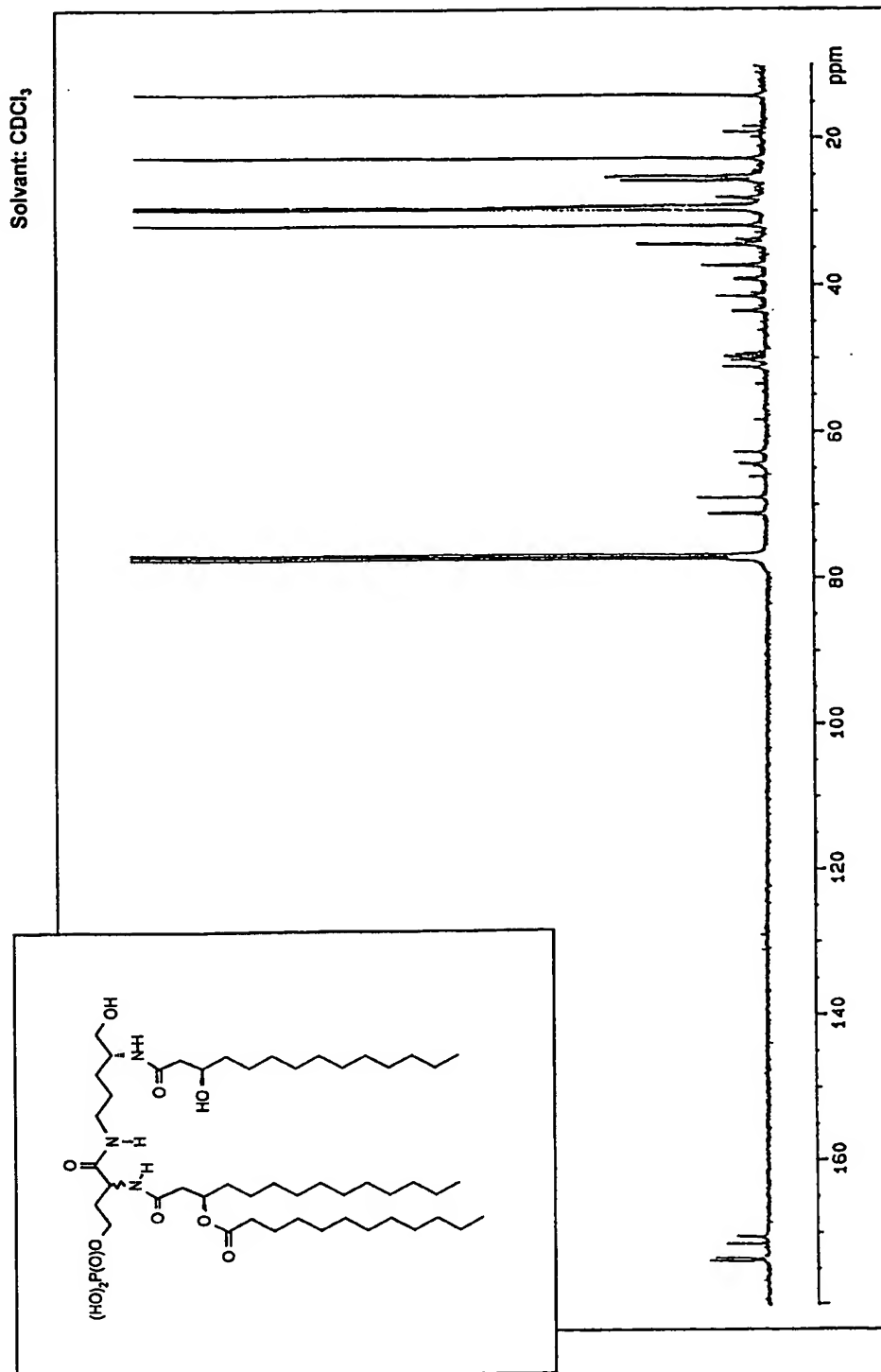


FIGURE 45

**Composé diphosphorylé**  
**Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN**

**SPECTRE 7**

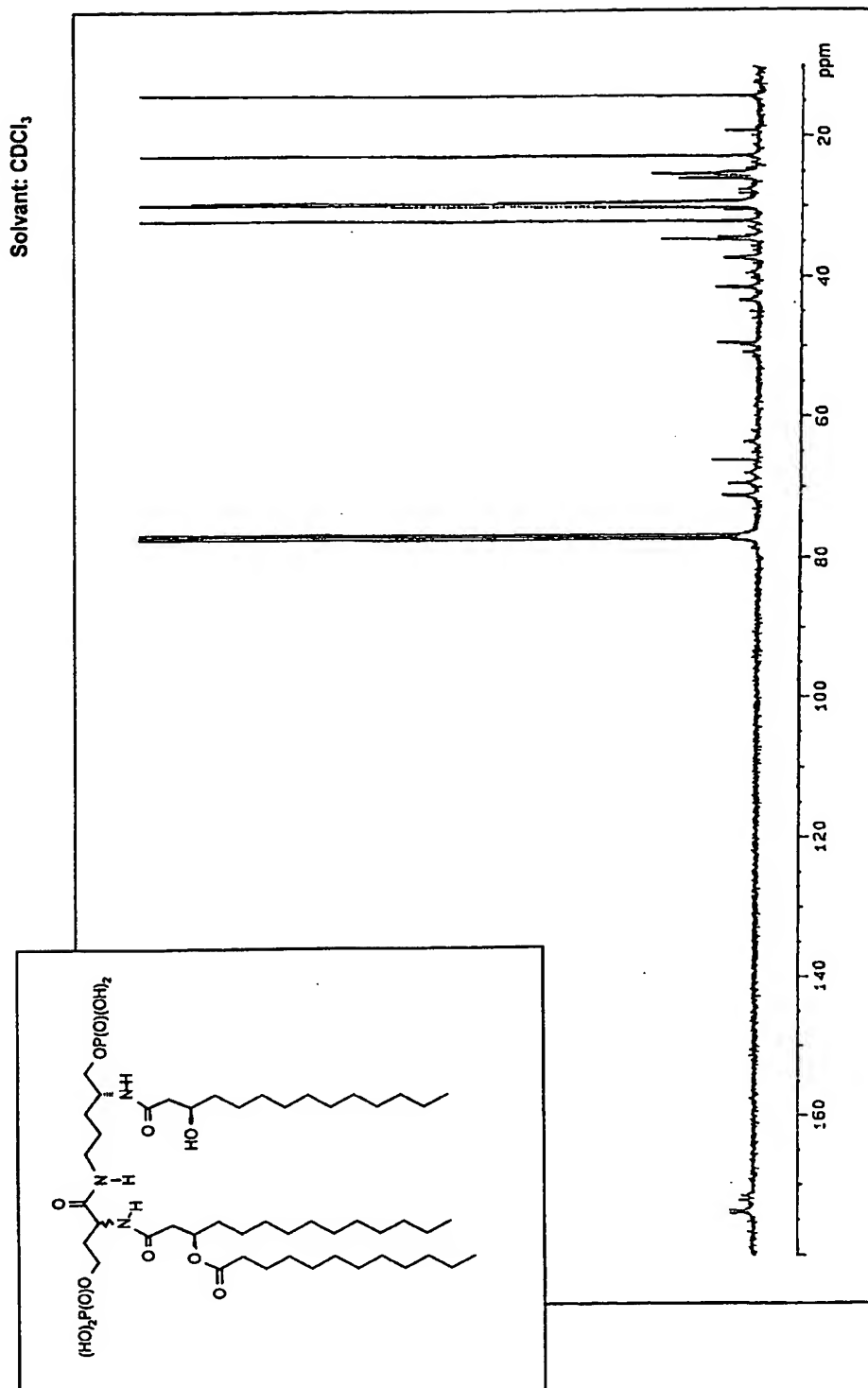
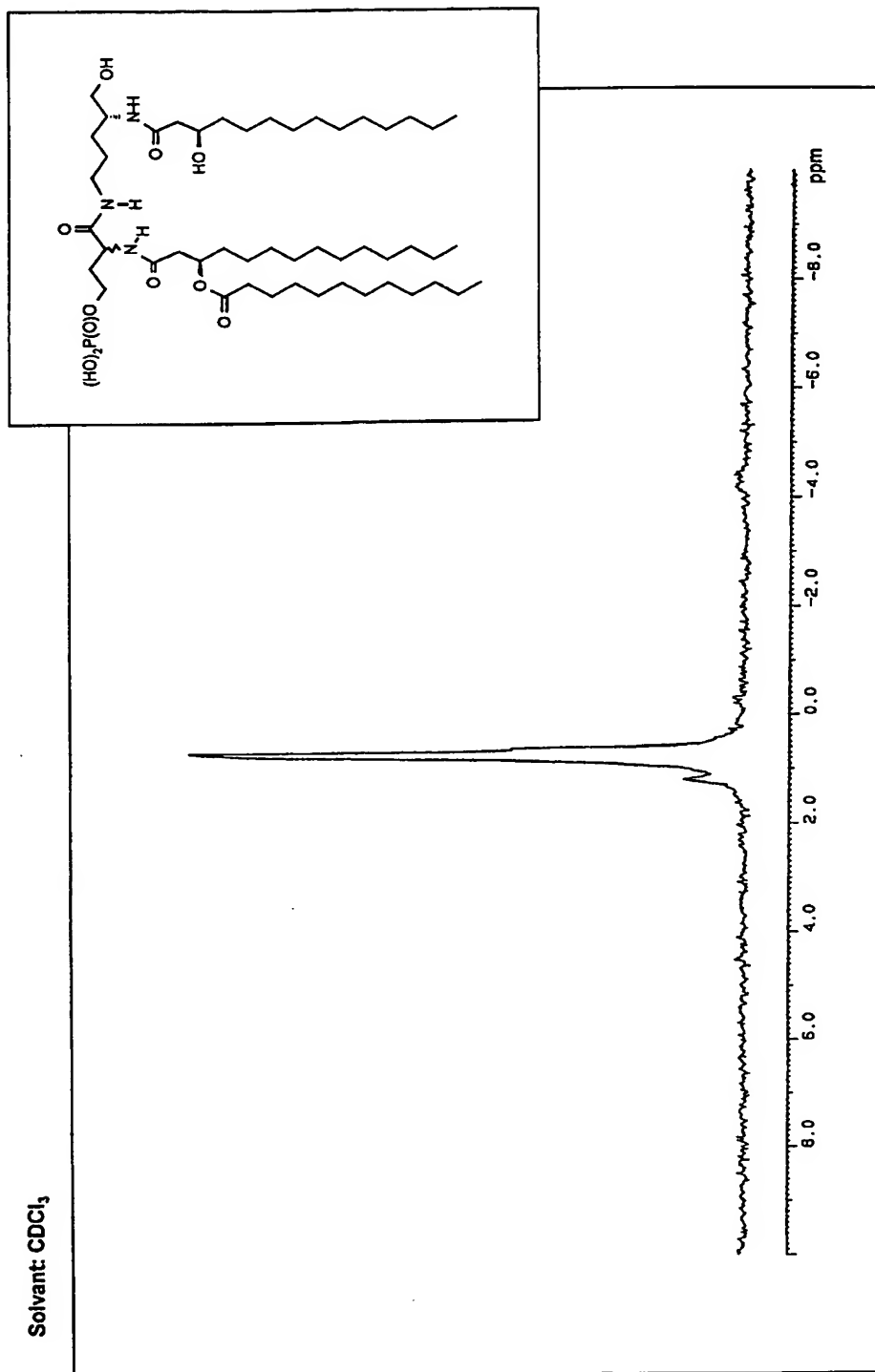


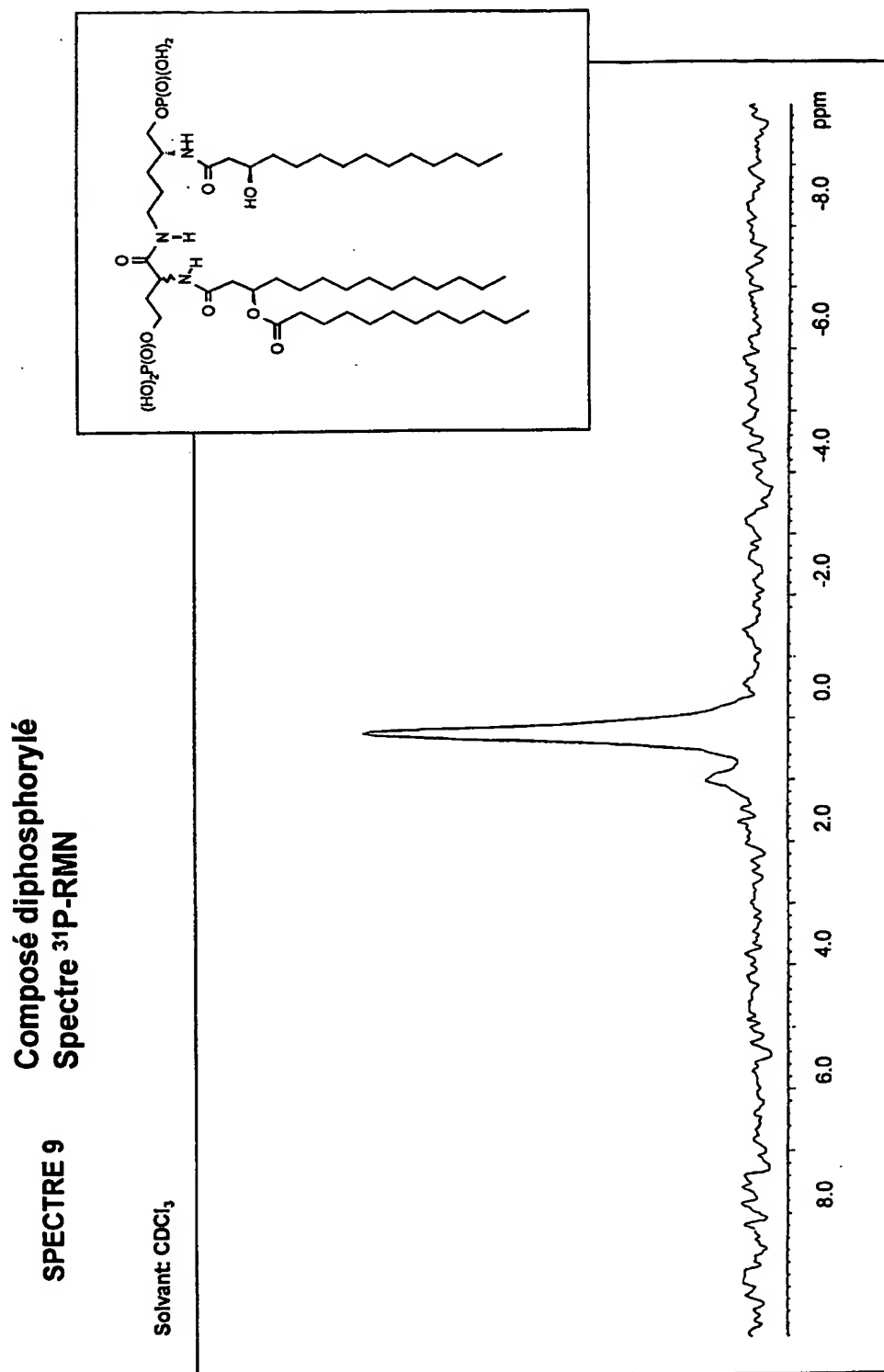
FIGURE 46

**SPECTRE 8**  
**Composé monophosphorylé**  
**Spectre  $^{31}\text{P}$ -RMN**

Solvant:  $\text{CDCl}_3$ 

Instrumentation: Bruker DPX 300 MHz

FIGURE 47



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/IB 99/01170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07C237/00 C07F9/09 A61K31/66 A61P37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07C C07F A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 14026 A (OM LAB SA ;DEUTSCHE OM ARZNEIMITTEL GMBH (DE); DAVIES JOHN GWYNFOR) 26 May 1995 (1995-05-26) ---	4-8
A	EP 0 668 289 A (SUNTORY LTD) 23 August 1995 (1995-08-23) ---	4-8
A	EP 0 224 260 A (TOHO YAKUHHN KOGYO KK) 3 June 1987 (1987-06-03) ---	4-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 069 (C-407), 3 March 1987 (1987-03-03) & JP 61 227586 A (DAI ICHI SEIYAKU CO LTD), 9 October 1986 (1986-10-09) abstract --- -/--	4-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 1999

Date of mailing of the international search report

29.09.99

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Janus, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No  
PCT/IB 99/01170

## C.(Continuation) DOCUMENTS C NSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 8, 25 August 1997 (1997-08-25) Columbus, Ohio, US; abstract no. 109122h, MIYAJIMA, K. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXXIII." page 624; XP002095371 abstract	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 45, no. 6, 1997, pages 1089-1093, ---	4-8
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 18, 5 May 1997 (1997-05-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 238583n, MIYAJIMA, K. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXXII." page 645; XP002095372 abstract	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 45, no. 2, 1997, pages 312-320, ---	4-8
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 3, 17 July 1995 (1995-07-17) Columbus, Ohio, US; abstract no. 33547v, SUHARA, Y. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXIX." page 902; XP002095373 abstract	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 42, no. 12, 1994, pages 2526-2531, -----	4-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/IB 99/01170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9514026 A	26-05-1995	AU 700485 B AU 1219495 A BR 9408071 A CA 2175375 A CN 1137799 A CZ 9601418 A EP 0729473 A HU 74738 A JP 9505071 T PL 314494 A SK 61396 A	07-01-1999 06-06-1995 24-12-1996 26-05-1995 11-12-1996 16-10-1996 04-09-1996 28-02-1997 20-05-1997 16-09-1996 06-11-1996
EP 0668289 A	23-08-1995	JP 6206893 A AU 679970 B AU 6219694 A US 5654289 A CA 2148824 A WO 9507285 A	26-07-1994 17-07-1997 27-03-1995 05-08-1997 16-03-1995 16-03-1995
EP 0224260 A	03-06-1987	JP 63030495 A JP 63044588 A JP 62129292 A US 4746742 A	09-02-1988 25-02-1988 11-06-1987 24-05-1988
JP 61227586 A	09-10-1986	JP 1856793 C JP 5069117 B	07-07-1994 30-09-1993



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 99/01170

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-3, 9-19 (all in part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See supplementary sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claims No.: 1-3, 9-19 (all in part)

Said Claims 1-3, and 9-19 concern a very large variety of compounds. In fact, said claims contain so many options and variables, very marginally supported by the examples, that the resulting lack of clarity as defined by PCT Article 6 is such that it is not possible to carry out any significant search on the subject matter. Consequently, the search was carried out for the parts of the application which appear to be clear, namely Claims 4-8 (compounds cited by name). A limited research was carried out for the other claims, particularly limited as regards the type of groups R1 and R2.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is warned that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/IB 99/01170

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07C237/00 C07F9/09 A61K31/66 A61P37/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07C C07F A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 14026 A (OM LAB SA ;DEUTSCHE OM ARZNEIMITTEL GMBH (DE); DAVIES JOHN GWYNFOR) 26 mai 1995 (1995-05-26) ---	4-8
A	EP 0 668 289 A (SUNTORY LTD) 23 août 1995 (1995-08-23) ---	4-8
A	EP 0 224 260 A (TOHO YAKUHI KOGYO KK) 3 juin 1987 (1987-06-03) ---	4-8
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 069 (C-407), 3 mars 1987 (1987-03-03) & JP 61 227586 A (DAI ICHI SEIYAKU CO LTD), 9 octobre 1986 (1986-10-09) abrégé --- -/-	4-8
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  16 septembre 1999		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  29. 09. 99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Fonctionnaire autorisé  Janus, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/IB 99/01170

C.(suite) DOCUMENTS C NSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 8, 25 août 1997 (1997-08-25) Columbus, Ohio, US; abstract no. 109122h, MIYAJIMA, K. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXXIII." page 624; XP002095371 abrégé	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 45, no. 6, 1997, pages 1089-1093, ---	4-8
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 18, 5 mai 1997 (1997-05-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 238583n, MIYAJIMA, K. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXXII." page 645; XP002095372 abrégé	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 45, no. 2, 1997, pages 312-320, ---	4-8
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 3, 17 juillet 1995 (1995-07-17) Columbus, Ohio, US; abstract no. 33547v, SUHARA, Y. ET AL.: "Lipid A and related compounds XXIX." page 902; XP002095373 abrégé	4-8
A	& CHEM. PHARM. BULL., vol. 42, no. 12, 1994, pages 2526-2531, -----	4-8

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/IB 99/01170

## **Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2. ☒ Les revendications n° 1-3, 9-19 (all in part)  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
  
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## **Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°
  
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-3, 9-19 (all in part)

Les revendications 1-3 et 9-19 présentes ont trait à une très grande variété de composés. En fait, les revendications contiennent tant d'options et de variables, très partiellement supportées par les exemples, que le manque de clarté au sens de l'Article 6 PCT qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires, c'est à dire les revendications 4-8 (composés cités nommément). Une recherche limitée a été effectuée sur les autres revendications, particulièrement limité en ce qui concerne la nature des groupes R1 et R2.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/IB 99/01170

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9514026	A	26-05-1995	AU 700485 B	07-01-1999
			AU 1219495 A	06-06-1995
			BR 9408071 A	24-12-1996
			CA 2175375 A	26-05-1995
			CN 1137799 A	11-12-1996
			CZ 9601418 A	16-10-1996
			EP 0729473 A	04-09-1996
			HU 74738 A	28-02-1997
			JP 9505071 T	20-05-1997
			PL 314494 A	16-09-1996
			SK 61396 A	06-11-1996
EP 0668289	A	23-08-1995	JP 6206893 A	26-07-1994
			AU 679970 B	17-07-1997
			AU 6219694 A	27-03-1995
			US 5654289 A	05-08-1997
			CA 2148824 A	16-03-1995
			WO 9507285 A	16-03-1995
EP 0224260	A	03-06-1987	JP 63030495 A	09-02-1988
			JP 63044588 A	25-02-1988
			JP 62129292 A	11-06-1987
			US 4746742 A	24-05-1988
JP 61227586	A	09-10-1986	JP 1856793 C	07-07-1994
			JP 5069117 B	30-09-1993